

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie, virologie



Bc. Lucie Pagáčová

Analýza miRNA u nádorů asociovaných s lidskými papilomaviry

Analysis of miRNAs in HPV-associated carcinomas

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 1. 2020

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Ruth Tachezy, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Šmahelové a RNDr. Martině Salákové, Ph.D. za metodickou pomoc a konzultace během výzkumu, RNDr. Jaroslavovi Nunvářovi, Ph.D. za odbornou pomoc se zpracováním dat a vyhodnocením výsledků, Zuzaně Vojtěchové, Ph.D. za cenné rady a celému laboratornímu týmu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě chci poděkovat celé své rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Papilomaviry jsou malé DNA viry, které jsou spojovány s indukcí epiteliálních nádorů. HPV je známý jako infekční agens způsobující téměř 100 % nádorů cervixu, ale může být též původcem karcinomů v dalších místech anogenitálního traktu či nádorů hlavy a krku mužů i žen. Aktivní infekce HPV navozuje změny exprese miRNA, které mohou dále přispívat ke vzniku a progresi nádorů. Je již známo, že papilomaviry nekódují své vlastní virové miRNA, ale mohou ovlivňovat expresi buněčných miRNA. V této diplomové práci jsem u vybraných typů epiteliálních nádorů (vulvy, cervixu, anu a tonsil) určila jejich etiologii. Výskyt miRNA v tkáních jsem otestovala pomocí sekvenování nové generace. Ze získaných dat jsem určila expresní profily deregulovaných miRNA ve vztahu ke zdravé tkáni příslušné lokalizace. Ačkoli byl analyzován dostatečný počet vzorků, z důvodu nepřítomnosti statisticky relevantních diferenciaciálně exprimovaných miRNA ve vulvárních nádorech pozitivních na HPV, nebylo možné prokazatelně určit HPV-core miRNA společné pro všechny testované nádory vyvolané HPV. Mezi nádory ostatních lokalizací jsem našla překryv ve třech miRNA. Jedna z těchto miRNA (miR-139-5p) a dále miR-9-5p, které jsem určila na základě studia ostatních publikovaných dat, byly následně vybrané pro funkční testování *in vitro*. U HPV pozitivních i negativních buněčných linií odvozených z nádorů hlavy a krku jsem provedla transfekci mimikující a/nebo inhibující miRNA a vliv transfekce jsem ověřila RT-qPCR. Transfekované buněčné linie budou sloužit k ověření potenciálních cílových genů těchto miRNA.

Klíčová slova: miRNA, papilomavirus, nádory hlavy a krku, nádory anogenitální oblasti, genová exprese, HPV-core miRNA

Abstract

Papillomaviruses are small DNA viruses that are associated with the induction of epithelial tumors. HPV is an important infectious agent causing almost 100 % of cervical tumors but it can also cause tumors in other anogenital and head and neck locations in both men and women. Active HPV infection induces changes in miRNA expression that contribute to the tumor formation and progression. It is already known that papillomaviruses do not encode their own viral miRNAs but they affect the expression of cellular miRNAs. In my thesis I have in selected epithelial tumors (vulva, cervix, anus and tonsils) determined their etiology and analyzed the presence of miRNAs in tissues by next generation sequencing. From these data I determined the expression profiles of deregulated miRNAs in tumors relation to healthy tissues of corresponding location. Even though, sufficient number of samples was analyzed, it was not possible to detect HPV-core miRNA common to all analyzed HPV-induced tumors due to the absence of statistically relevant differentially expressed miRNAs in HPV positive vulvar tumors. Among the tumors of the other sites I found an overlap in three miRNAs. One of these miRNAs (miR-139-5p) and another one (miR-9-5p) which I have selected based on the study of other published data, were used for functional *in vitro* testing. In HPV positive and negative cell lines derived from head and neck tumors I performed the transfection of mimicking and / or inhibiting miRNA and confirmed the effect of transfection by RT-qPCR. Transfected cell lines will serve for further testing of the potential target genes of these miRNAs.

Key words: miRNA, papillomavirus, head and neck tumors, tumors of anogenital region, gene expression, HPV-core miRNA

Obsah

1	Seznam zkratek	7
2	Úvod.....	10
3	Cíle práce	11
4	Přehled literatury.....	12
4.1	Lidské papilomaviry.....	12
4.1.1	Klasifikace	12
4.1.2	Genom a proteiny HPV	13
4.1.3	Životní cyklus	15
4.1.4	Mechanismus onkogeneze papilomavirů.....	15
4.1.5	Epidemiologie.....	16
4.2	MiRNA.....	17
4.2.1	Nomenklatura miRNA.....	18
4.2.2	Biogeneze miRNA.....	19
4.3	Deregulace exprese hostitelských miRNA u HPV-asociovaných malignit	21
4.3.1	MiRNA u HPV asociovaných nádorů cervixu	22
4.3.2	MiRNA u HPV asociovaných nádorů hlavy a krku	26
4.3.3	MiRNA u vulvárních HPV asociovaných nádorů	27
4.3.4	MiRNA u análních HPV asociovaných nádorů.....	28
4.3.5	HPV-core miRNA.....	29
4.4	Diagnostické a terapeutické využití miRNA u HPV.....	30
5	Materiál a metody	32
5.1	Vzorky a jejich příprava.....	32
5.2	Izolace nukleových kyselin a kontrola kvality a kvantity	33
5.2.1	Určení délek fragmentů DNA.....	36
5.3	Určení genotypu papilomaviru.....	38

5.4	Detekce genu E6 HPV16.....	40
5.5	Průkaz aktivní infekce HPV	40
5.5.1	Reverzní transkripce.....	41
5.5.2	Detekce virové mRNA E6 typu HPV16	42
5.6	Analýza expresního profilu miRNA metodou sekvenace nové generace	43
5.7	Analýza dat a statistické zpracování.....	43
5.8	Buněčné linie	45
5.8.1	Buněčné linie a média	45
5.8.2	Práce s buněčnými kulturami	47
5.9	Izolace RNA z buněčných linií.....	48
5.10	Ověření exprese miRNA v buněčných liniích	49
5.11	Transfekce mimikující/inhibující miRNA do buněčných linií	51
5.12	Ověření transfekce mimikujícími/inhibujícími miRNA	53
6	Výsledky.....	55
6.1	Izolace nukleových kyselin	55
6.1.1	Určení délek fragmentů DNA	59
6.2	Určení genotypu papilomaviru	61
6.3	Detekce genu E6 HPV16.....	64
6.4	Průkaz aktivní infekce HPV	65
6.5	Sekvenování nové generace – analýza a statistické zpracování dat	68
6.6	Ověření exprese miRNA v buněčných liniích.....	75
6.7	Ověření transfekce mimikujícími/inhibujícími miRNA.....	79
7	Diskuze.....	86
8	Souhrn	92
9	Seznam použité literatury.....	93
10	Příloha	I

1 Seznam zkratek

zkratka	anglický název	český název
AA	adenine, adenine	adenin, adenin
AC	-	anální karcinom
ACN	-	zdravá anální tkáň
AG	adenine, guanine	adenin, guanin
Ago	argonaute	argonaut
Akt	protein kinase B	protein kináza B
Alu	Arthrobacter luteus restriction endonuclease	Arthrobacter luteus restriční endonukleáza
AU	adenine, uracil	adenin, uracil
Bio-BSGP6+	broad-spectrum primers 5' biotinylated targeting the GP6+ region	širokospektrální primery značeny na 5' konci biotinem cílící GP6+ region
BSGP5+	broad-spectrum primers targeting the GP5+ region	širokospektrální primery cílící na GP5+ region
CAAP1 (C9orf82)	Caspase Activity and Apoptosis Inhibitor	inhibitor kaspázové aktivity a apoptózy
CCNA2	cyclin A2	cyklin A2
CCNB1, CCNB2	cyclin B1, cyclin B2	cyklin B1, cyklin B2
cDNA	complementary cDNA	komplementární cDNA
CIN	cervical intraepithelial neoplasia	cervikální intraepiteliální neoplazie
CN	-	cervikální zdravá tkáň
CO₂	carbon dioxide	oxid uhličitý
CpG	5' – cytosine – phosphate – guanine - 3'	5' - cytosin – fostát – guanin – 3'
CT	-	cervikální nádorová tkáň
Ct	cycle of treshold	cyklus prahové hodnoty
DGCR8	DiGeorge syndrome chromosomal region 8	chromozomální region 8 DiGeorgeova syndromu
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates	deoxynukleotid trifosfáty
dsRBP	double-strand RNA binding proteins	proteiny vázající dvoušroubovici RNA
E1 - E7	early protein 1 – 7	časný protein 1 - 7
E2F	E2 factor	faktor E2
E6AP	E6 associated protein	protein asociovaný s E6
EBV	Epstein–Barr virus	virus Epsteina-Barrové
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4E	eukaryotický iniciační faktor 4E
eIF6	eukaryotic translation initiation factor 6	eukaryotický faktor 6 iniciace translace
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	Evropská laboratoř pro molekulární biologii

EMEM	Eagle's minimim essential medium	Eagleovo minimální základní médium
Exp5	exportin 5	exportin 5
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
FC	fold change	změna exprese
FF	fresh frozen	čerstvě mražené
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded	fixované formalínem zalité v parafínu
FN	-	fakultní nemocnice
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GG	guanine, guanine	guanin, guanin
GOLM1	Golgi membrane protein 1	protein Golgiho membrány 1
HDAC	histone deacetylase	histonová deacetyláza
HE	hematoxylin-eosin	hematoxylin-eosin
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku
HOXB8	homeobox B8	homeobox B8
HPRT	hypoxantine phosphoribosyltransferase	hypoxantin fosforibosyl transferáza
HPV	human papillomavirus	lidský papilomavirus
HR - HPV	high-risk human papillomavirus	vysoce-rizikové lidské papilomaviry
hsa	Homo sapiens	Homo sapiens
HSPG	heparin sulfate proteoglycan	heparin sulfát proteoglykan
IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	indoleamin 2,3-dioxygenáza 1
IRB	Ruđer Bošković Institute	Ruđer Bošković Institut
kDa	kilodalton	kilodalton
kpb	kilobase pair	1000 párů bazí
KV	-	Královské Vinohrady
L1, L2	late protein 1 - 2	pozdní protein 1 - 2
LAMB3	laminin subunit beta-3	lamininová podjednotka beta-3
LCR	long control region	dlouhý kontrolní region
LR - HPV	low-risk human papillomavirus	nízce-rizikové lidské papilomaviry
MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	mitogen aktivovaná protein kináza kináza kináza 2
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	komplex komponent 7 udržující minichromozom
miRISC	miRNA-induced silencing complex	indukovaný miRNA umlčující komplex
miRNA	microRNA	mikroRNA
mmn	Mus musculus	Mus musculus
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
MSH6	MutS Homolog 6	MutS Homolog 6
mTOR	mechanistic target of rapamycin	mechanistické cílové místo rapamycinu
NaCl	sodium chloride	chlorid sodný
NaH₂PO₄	monosodium phosphate	dihydrogenfosforečnan sodný
Nanog	homeobox transcription factor nanog	homeobox transkripčního faktoru nanog
NB	untransfected cells	netransfekované buňky

NGS	next generation sequencing	sekvenování nové generace
nt	nucleotide	nukleotid
Oct4	POU class 5 homeobox 1	homeobox 1 POU třídy 5
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A
p53	tumor protein p53	nádorový protein p53
p_{adj}	<i>p</i> -value adjusted for multiple testing	hodnota <i>p</i> upravená pro vícenásobné testování
pb	base pair	páry bazí
PC1, PC2	principal component 1 - 2	hlavní komponenta 1 - 2
PCA	principal component analysis	analýza hlavních komponent
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza
pre-mRNA	precursor-microRNA	prekurzorová mikroRNA
pri-mRNA	primary-microRNA	primární mikroRNA
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
RISC	RNA induced silencing complex	RNA indukovaný umlčovací komplex
RLB	reverse line blot assay	zpětná sloupcová hybridizace
RLC	RISC-loading complex	RISC navazující komplex
RNU48	small nucleolar RNA, C/D box 48	malá jaderná RNA, C/D box 48
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	médium vyvinuté v Roswell Park Memorial Institutu
RT-qPCR	reverse transcription quantitative PCR	kvantitativní PCR s produktem reverzní transkripce
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecylsírán sodný
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
Sox1	Sox1 transcription faktor	transkripční faktor Sox1
SSPE	saline-sodium phosphate-EDTA	chlorid sodný - dihydrogenfosforečnan sodný-EDTA
TBE	Tris - borate - EDTA	Tris - borát - EDTA
TNM	tumor-nodes-metastases	nádory-uzliny-metastázy
TRBP	TAR RNA binding protein	TAR RNA vazebný protein
TT	-	nádorová tkáň tonsil
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
VN	-	vulvární zdravá tkáň
VT	-	vulvární nádorová tkáň

2 Úvod

MicroRNA (miRNA) jsou nekódující ~22 nt dlouhé regulační RNA, které váží mRNA (messenger RNA) v důsledku čehož dochází k inhibici translace a/nebo degradaci této mRNA. MiRNA prochází složitou biogenezí, kdy jsou postupně sestříhovány z prekurzorových sekvencí a transportovány z jádra do cytoplazmy, kde vzniká maturovaná miRNA.

MiRNA regulují až dvě třetiny lidských genů. Jejich aberantní exprese se objevuje u většiny lidských nádorů a je spojena i s dalšími nemocemi jako je obezita či diabetes (Xie *et al.*, 2009; Zampetaki *et al.*, 2010). Vzhledem k jejich malé velikosti a výskytu téměř ve všech tělních tekutinách se o nich uvažuje jako o vhodných diagnostických či terapeutických cílech. Geny miRNA a následně i jejich aktivní exprese byla objevena také u některých nádorových virů (hepadnaviry, adenoviry, herpesviry a polyomaviry). Jejich výskyt však nebyl doposud prokázán u lidských papilomavirů (HPV). Přesto mohou tyto viry svými onkoproteiny (E5, E6, E7) regulovat expresi buněčných miRNA.

V naší laboratoři se dlouhodobě zabýváme výzkumem nádorů asociovaných s vysoce-rizikovými papilomaviry, které způsobují dlaždicobuněčné karcinomy anogenitální oblasti a hlavy a krku. Z počátku byl výzkum diferenciální exprese miRNA zaměřený pouze na nádory hlavy a krku, které slouží jako model dvojí etiologie a jejich překryv s miRNA diferenciálně exprimovanými u cervikálních nádorů, které jsou téměř ve 100 % vyvolány HPV. Doposud na toto téma vyšly pouze dvě studie, které mezi sebou nenašly překryv mezi diferenciálně exprimovanými miRNA.

V mé práci jsem navázala na studii Vojtěchové a kol. a zaměřila jsem se na identifikaci HPV-core miRNA v nádorech asociovaných s vysoce rizikovými papilomaviry i v jiných anatomických lokalizacích.

3 Cíle práce

Práce se snaží potvrdit či vyvrátit hypotézu: „Pro dlaždicobuněčné karcinomy různé anatomické lokalizace, způsobené aktivní infekcí vysoce-rizikovým papilomavirem typu 16, existuje jedna či více společných miRNA s diferenciální expresí ve srovnání se zdravou tkání odpovídající lokalizace.“ Takové miRNA by mohly sloužit jako diagnostické či terapeutické cíle. Pokud budou takové miRNA nalezené, bude třeba analyzovat jejich funkci a cílové geny.

Dílčí cíle jsou:

1. Izolace celkové RNA a DNA ze souboru nádorů vulvy, cervixu a anu a ze souboru ekvivalentních zdravých tkání. Určení kvality nukleových kyselin. Určení etiologie nádoru.
2. Analýza expresních profilů miRNA 4 druhů nádorů pozitivních a negativních na HPV a příslušných zdravých tkání metodou sekvenování nové generace (NGS).
3. Analýza získaných dat a stanovení tzv. HPV-core miRNA, tedy miRNA specifických pro nádory pozitivní na HPV různých lokalizací.
4. Provedení *in vitro* testů na lidských nádorových liniích pozitivních a negativních na HPV.

4 Přehled literatury

4.1 Lidské papilomaviry

Papilomaviry jsou neobalené viry s kruhovou DNA o velikosti ~8 kpb, které se řadí do čeledi *Papillomaviridae*. Mají ikosahedrální kapsidu o velikosti 55 nm. Doposud bylo objeveno celkem 280 typů papilomavirů, které infikují vyšší obratlovce, z nichž 198 typů napadá výhradně kůži a slizniční tkáň člověka (Bzhalava *et al.*, 2015). Virus proniká do hostitele bezprostředním kontaktem mechanicky narušeného epitelu s infikovaným jedincem. Nejčastěji k narušení epitelu usnadňujícímu následný přenos HPV dochází při nechráněném pohlavním styku.

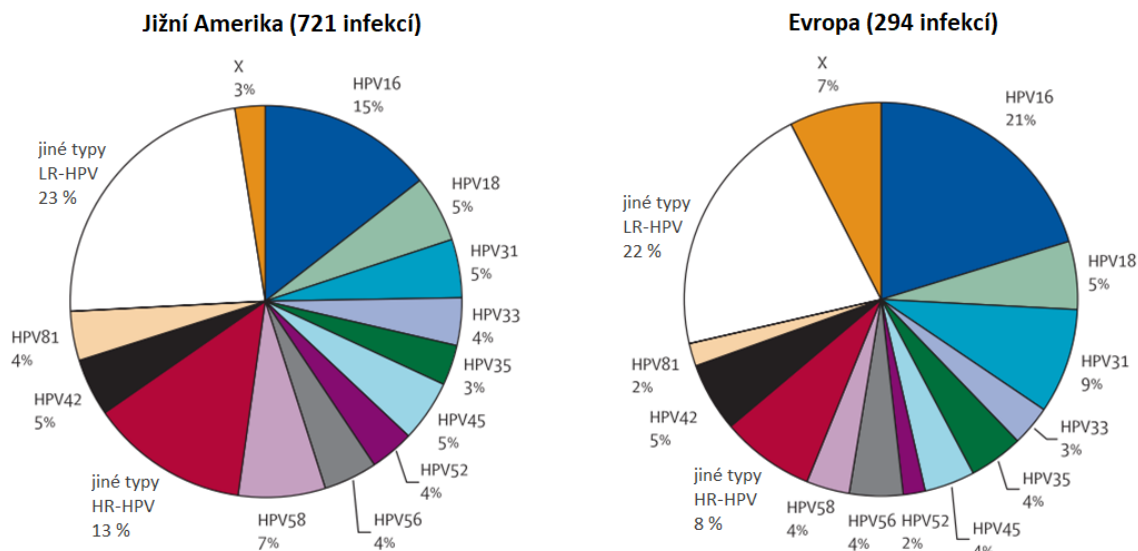
V roce 2008 se stal laureátem Nobelovy ceny v oblasti fyziologie a medicíny profesor Harald zur Hausen za hypotézu, kterou vyslovil již v roce 1976. Tato hypotéza hovořila o kausálním spojení HPV s karcinomem cervixu (zur Hausen 1976). O několik let později se tato teorie potvrdila izolací DNA papilomavirů z karcinomu cervixu (Boshart *et al.*, 1984). Dnes již víme, že HPV je celkově zodpovědné za 30 % nádorových onemocnění způsobených infekčními agens a je spojováno s malignitami nejen cervixu, ale také vulvy, vaginy, penisu, anu a orofaryngu (zur Hausen 2009).

4.1.1 Klasifikace

Čeď *Papillomaviridae* se na základě genové homologie kapsidového proteinu L1 (L, late) rozděluje do 52 rodů (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Lidské papilomaviry se řadí do pěti rodů: α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus a ν -papillomavirus.

Dle genotypu papilomaviry rozdělujeme na vysoce-rizikové (HR, high risk) a níže-rizikové (LR, low risk). Do skupiny HR-HPV řadíme 14 typů papilomavirů: HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -66 a -68, všechny z rodu α -papillomavirus. HR-HPV mají maligní potenciál, vyvolávají premaligní léze a karcinomy. LR-HPV vyvolávají benigní léze. Distribuce genotypů HPV v populaci není rovnoměrná a liší se dle geografické lokalizace, ale výskyt HPV16 je celosvětově téměř

dvojnásobný v porovnání s jinými typy HPV (Obr. 1) (Clifford *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2015). Mezi nejčastěji se vyskytující HR-HPV patří HPV-16, -18, -31, -33, -45, u LR-HPV to jsou HPV-6 a -11.



Obr. 1 Procentuální rozložení výskytu HPV v Jižní Americe a Evropě (převzato a upraveno Clifford *et al.*, 2005).

4.1.2 Genom a proteiny HPV

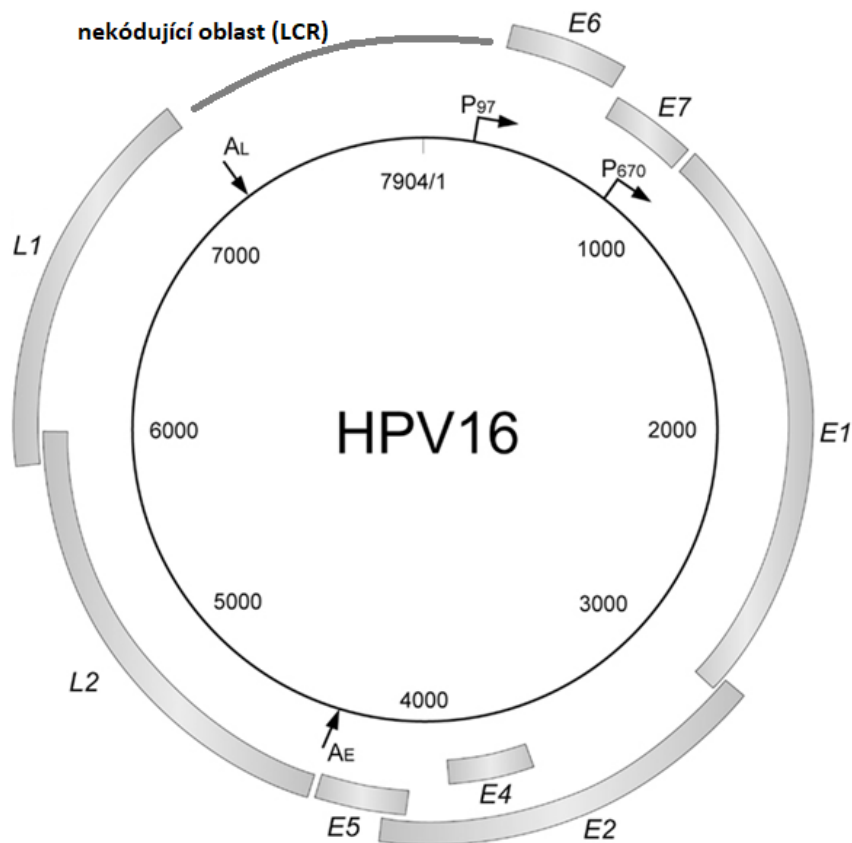
Dvouvláknový kruhový DNA genom papilomavirů je rozdělen na tři oblasti: na oblast časných genů (E, early), oblast pozdních genů (L, late) a nekódující oblast (LCR, long control region) (Obr. 2).

Mezi pozdní geny patří kapsidové proteiny L1 a L2. L1 je hlavní protein na povrchu virové kapsidy o velikosti 55 kDa. Minoritní protein L2 o velikosti 64 – 78 kDa je nezbytný pro vstup viru do buňky a sestavení virové kapsidy. Oba tyto proteiny jsou produkovány v horních vrstvách epitelu, kde jsou keratinocyty terminálně diferencované.

Nekódující oblast LCR leží mezi otevřeným čtecím rámcem L1 a E6. Obsahuje počátek replikace a kontroluje replikaci a transkripci genomu.

Časné proteiny E1, E2, E5, E6 a E7 jsou přepisovány krátce po infekci. Výjimkou je protein E4, který je přepisován spolu s pozdními geny a přispívá k uvolnění virové částice z buňky. Vzniká ve svrchních vrstvách epitelu a rozkládá vlákna cytokeratinu. Protein E1 zastává funkci helikázy, spolu s proteinem E2 tvoří komplex a napomáhají

replikaci virového genomu. Virový protein E5 je membránově vázaný onkoprotein, který tvoří kanál viroporin, důležitý pro udržení homeostáze, také se významně podílí na proliferaci buňky a inhibici imunitní odpovědi (Zhang *et al.*, 2003). Proteiny E6 a E7 jsou hlavními onkoproteiny papilomavirů, dále se jim věnuji v podkapitole Mechanismus virové onkogeneze.



Obr. 2 Kruhový dsDNA genom papilomaviru HPV16 (převzato a upraveno Kajitani *et al.*, 2012*).

4.1.3 Životní cyklus

Papilomaviry infikují výhradně epitelu kožní či slizniční. Virová částice proniká narušeným epitelem k bazální membráně, kde se vyskytují mitoticky aktivní buňky. Kapsidový protein L1 interaguje s proteoglykany heparansulfátového receptoru (HSPG, heparin sulfate proteoglycan) plazmatické membrány těchto buněk, a tím dochází ke konformační změně kapsidy (Giroglou *et al.*, 2001). Na povrch je vystaven protein L2, jehož N-koncová doména je štěpena furinem, což vede k druhé konformační změně, díky které se virus váže s receptory plazmatické membrány bazální vrstvy epitelu a endocytózou vstupuje do buňky (Kines *et al.*, 2009). Ve vzniklém endozómu se snižuje pH a virová kapsida se postupně rozpadá. Zatímco protein L1 podléhá degradaci, protein L2 tvoří komplex s cirkulární DNA papilomaviru a cílí ji do buněčného jádra (Marušič *et al.*, 2012). Virus k replikaci využívá časné proteiny E1 a E2, které tvoří komplex s hostitelským transkripčním aparátem. Genom HPV může v buněčném jádře perzistovat ve formě extrachromozomálního epizomu, nebo se integrovat do hostitelského genomu. Integrace viru je častější u zhoubných nádorů vyvolanými papilomaviry než u premaligních stádií, ale její frekvence se liší v závislosti na anatomické lokalizaci nádoru a typu HPV (Hu *et al.*, 2015*; Gao *et al.*, 2019). Transkripce pozdních genů probíhá až ve svrchních vrstvách epitelu, kde také dochází k produkci infekčních virionů a následné degradaci buňky.

4.1.4 Mechanismus onkogeneze papilomavirů

Během diferenciaci buněk epitelu se postupně zvyšuje počet virových kopií v cytoplazmě. Vzhledem k tomu, že virus je závislý na replikačním aparátu hostitele, manipuluje buňku do S fáze buněčného cyklu, k čemuž využívá vlastní časné proteiny E6 a E7.

Na C-koncové doméně proteinu E6 se nachází PDZ vazebná doména, kterou onkoprotein váže a následně degraduje proteiny s PDZ doménou, jenž se podílejí na udržení integrity buněk a regulaci signálních drah. Dále interaguje s tumor-supresorovým

transkripčním faktorem p53 a spouští jeho degradaci. E6 také aktivuje transkripci *c-myc* genu a genu pro telomerázu, což vede k abnormálnímu přežívání buněk.

Onkoprotein E7 váže retinoblastomový protein (pRb, retinoblastoma protein), který je následně fosforylován a uvolňuje transkripční faktor E2F, jenž se podílí na přechodu buněčného cyklu do S fáze či přímo interaguje s histonovými deacetylázami (HDAC, histone deacetylase). Některé studie též prokázaly vliv proteinu E7 na destabilizaci dvoušroubovice DNA (Wook *et al.*, 2014).

Neméně významným onkoproteinem je E5, který zvyšuje jak aktivitu EGFR (epidermal growth factor receptor) dráhy, tak immortalizační potenciál E6 a E7 proteinů v infikovaných keratinocytech. Jeho aktivita se ztrácí při integraci virového genomu do hostitelské DNA, proto hraje důležitou roli v počátečních stádiích infekce (Wasson *et al.*, 2017).

Až u 60 % zhoubných nádorů cervixu způsobených papilomaviry byl v hostitelském genomu nalezen integrovaný genom HPV (Vinokurova *et al.*, 2008). K integraci nejčastěji dochází v oblasti *E2* genu, který tak ztrácí svou regulační funkci a v důsledku toho se zvyšuje transkripce *E6* a *E7* onkogenů. K integraci viru dochází ve fragilních a/nebo transkripčně aktivních místech bez chromozomální preference (Jeon *et al.*, 1995). Nádorová transformace však nemusí být vždy závislá na onkoproteinech. HPV se může náhodně včlenit do hostitelského genomu a způsobit mezichromozomální přestavby, které vedou ke snížené expresi tumor-supresorových genů či zvýšené expresi buněčných onkogenů (Parfenov *et al.*, 2014).

4.1.5 Epidemiologie

Jak již bylo řečeno, papilomaviry způsobují nádory dlaždicových buněk cervixu, vulvy, vaginy, penisu, anu a orofaryngu. Nejvýznamnější je působení HPV v nádorech cervixu, kde je téměř až 100 % karcinomů pozitivních na HPV (Walboomers *et al.*, 1999). Každým rokem přibývá až 530 000 nových případů nádorů cervixu, avšak více jak dvě třetiny se objevují v méně rozvinutých zemích (de Martel *et al.*, 2017).

V anogenitální oblasti je nejfrekventovanější výskyt análního karcinomu, u kterého byl virus HPV nalezen téměř v 90 % nádorů a je zastoupen rovnoměrně mezi

oběma pohlavími. Nejnižší zastoupení malignit pozitivních na HPV má v této anatomické lokalizaci vulva, výskyt HPV se prokázal pouze u 25 % nádorů (de Martel *et al.*, 2017).

Nádory orofaryngu jsou další oblastí, kde byla prokázána kauzální spojitost s HPV infekcí. Výskyt HPV byl potvrzen u 31 % nádorů. Na rozdíl od cervixu, je přítomnost karcinomů orofaryngu pozitivních na HPV vyšší ve vyspělých zemích a častěji jimi trpí muži než ženy (de Martel *et al.*, 2017).

Prevalence nádorů cervixu, anu a vulvy pozitivních na HPV, v České republice se od světové populace mírně liší. U nádorů cervixu bylo prokázáno 95 % případů pozitivních na HPV, karcinomy anu byly pozitivní na HPV v 82 % případů a ve 35 % vulvárních karcinomů byl také prokázán výskyt HPV (Tachezy *et al.*, 2011). Prevalence nádorů orofaryngu pozitivních na HPV se v České republice pohybuje okolo 60 % (Koslabova *et al.*, 2013).

V roce 2006 byla na trh uvedena první tetraivalentní vakcína proti HPV-6, -11, -16, -18 (Siddiqui *et al.*, 2006), v roce 2007 bivalentní vakcína proti HPV-16, -18. Devítivalentní vakcína je dostupná od roku 2014 a chrání proti HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52 a -58. Všechny vakcíny jsou založeny na vzniku pentamerů L1 proteinu produkovaného v rekombinantních systémech. Ty pak spontánně agregují do viru podobných částic.

4.2 MiRNA

MiRNA jsou ~22 nukleotidů dlouhé nekódující jednořetězcové RNA, které se váží ke komplementárním úsekům mRNA, a tím regulují genovou expresi. MiRNA se podílejí na mnoha buněčných procesech jako je proliferace, apoptóza či diferenciace buněk. Dnes je známo 38 589 prekurzorů miRNA a 48 885 maturovaných miRNA, z čehož je 2 654 miRNA lidských (www.mirbase.org, říjen 2018). Každá z těchto miRNA může regulovat translaci z několika různých mRNA, stejně jako translace z jedné mRNA může být regulována různými miRNA. Aberantní exprese miRNA byla objevena u mnohých chorob od obezity až po nádory (Xie *et al.*, 2009; Au Yeung *et al.*, 2011).

Také některé onkogenní DNA viry kódují vlastní miRNA. Tyto miRNA prochází shodnou biogenezí jako buněčná miRNA. Exprese vlastních miRNA byla objevena u hepadnavirů, herpesvirů, polyomavirů a adenovirů. U papilomavirů nebyly nalezeny žádné virové miRNA, přesto papilomaviry dokáží svými proteiny deregulovat expresi buněčných miRNA a měnit tak vlastnosti buňky (Martinez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

Je velmi nepravděpodobné, že by exprese virových miRNA probíhala u RNA virů, díky jejich replikaci v cytoplazmě. Rozdíl můžeme pozorovat u retrovirů, jejichž RNA je přepisována reverzní transkriptázou na DNA a transportována do jádra, i přesto je však exprese jejich vlastních miRNA stále kontroverzní téma a není zcela potvrzena (Bernard *et al.*, 2014).

4.2.1 Nomenklatura miRNA

Od prvního objevu miRNA jako regulační sekvence uběhlo již téměř 30 let (Lee *et al.*, 1993) a od té doby se postupně vyvíjí také nomenklatura miRNA, stává se postupně přehlednější a zohledňuje evoluční a fylogenetické aspekty.

První miRNA, která byla pojmenována *lin-4*, byla pozorována u živočišného druhu *Caenorhabditis elegans*, kde se ukázalo, že kontroluje larvální vývoj inhibicí mRNA genu *lin-14* (Lee *et al.*, 1993). Tato miRNA, stejně jako miRNA *let-7*, si z historického hlediska zachovala tento typ pojmenování.

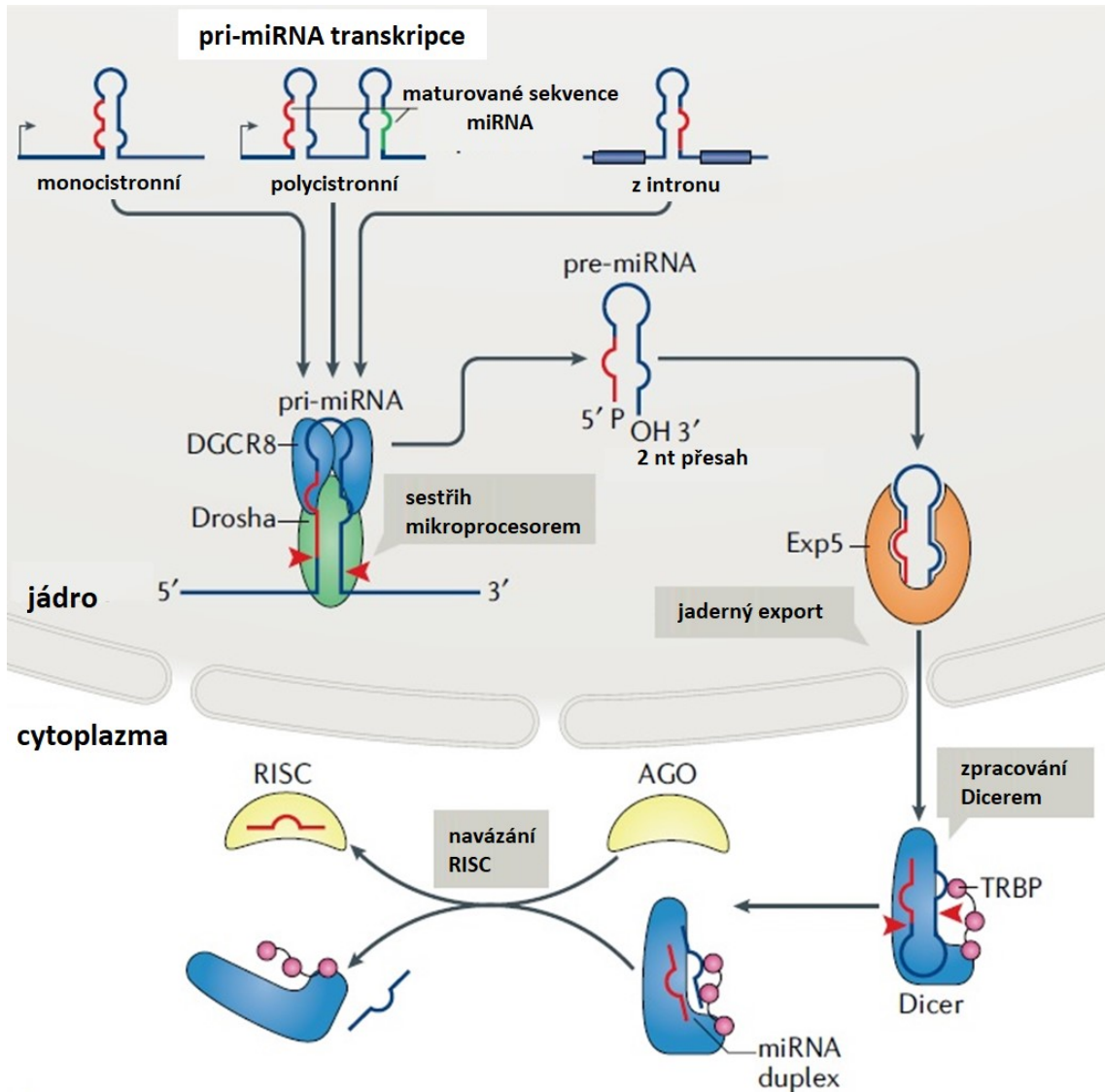
Dnes již víme, že samotná miRNA prochází několika stádii sestříhu, a proto máme odlišná pojmenování pro prekurzorovou vlásenku „mir“ a maturovanou miRNA „miR“, za které se následně přidává identifikační číslo, např. „miR-21“. V databázích miRNA se před samotný název přidává třípísmenná zkratka určující živočišný druh tedy např. „hsa-miR-21“ (*Homo sapiens*) či mmu-miR-105 (*Mus musculus*). Pokud jsou maturované sekvence miRNA evolučně příbuzné a liší se pouze v jednom nebo dvou nukleotidech, řadí se do jedné rodiny a vzájemně se odlišují písmenem za identifikačním číslem „hsa-miR-199a“, „hsa-miR-199b“. Může se také stát, že dva různé genové lokusy produkují identickou miRNA, v tomto případě miRNA rozdělujeme konečným číslem „hsa-miR-199a-1“ a „hsa-miR-199a-2“. Prekurzorová vlásenka se v průběhu biogeneze štěpí na dvě protilehlé miRNA, z nichž může jedna být degradovaná či obě zachovány.

Dříve se používalo značení „hsa-miR-124“ pro funkční maturovanou miRNA vznikající z tzv. dominantního ramene pre-miRNA. Pro miRNA z druhého ramene vlásenky, bylo použité označení „hsa-miR-124*“, tato miRNA byla považována za nefunkční. Později se však ukázalo, že funkční maturované miRNA mohou vznikat z obou ramen pre-miRNA, proto se začalo používat označení „hsa-miR-9-5p“ a „hsa-miR-9-3p“. (www.mirbase.org).

4.2.2 Biogeneze miRNA

Geny kódující miRNA se nacházejí jak v intronech, tak v exonech genů nekódujících proteiny a také byly nalezeny v intronech genů kódujících proteiny (Rodriguez *et al.*, 2004). MiRNA mohou být přepisovány jako monocistronní či polycistronní transkript, který je dlouhý i několik stovek nukleotidů a označujeme jej jako primární miRNA (pri-miRNA). Samotný přepis pri-miRNA zajišťuje RNA polymeráza II (Lee *et al.*, 2004), pokud je však miRNA kódována v repetitivní Alu sekvenci, transkripci genu zajišťuje RNA polymeráza III (Borchert *et al.*, 2006). Pri-miRNA zůstává v jádře buňky, kde se na ni váže komplex proteinů zvaný mikroprocesor (Obr. 3), jenž se skládá z RNA III endonukleázy Drosha, proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8), proteinů vázajících dvoušroubovici RNA (dsRBP; double-strand RNA binding proteins) a pomocných faktorů DDX5 a p72. Mikroprocesor zajišťuje štěpení pri-miRNA na ~70 nukleotidů dlouhou prekurzorovou miRNA (pre-miRNA), ta je následně Exportinem 5 (Exp5) s kofaktorem Ran přenesena z jádra do cytoplazmy, kde se na ni váží TAR RNA vazebné proteiny (TRBP; TAR RNA binding protein) a RNáza III Dicer, jenž ji štěpí na ~22 nukleotidů dlouhé dvouvláknové miRNA označované jako miRNA/miRNA* duplex (Obr. 3) (Yi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). Na duplex se váže komplex RISC (RNA induced silencing complex) navazující komplex (RLC, RISC-loading complex), jehož součástí jsou proteiny Argonaut (Ago) s endonukleázovou aktivitou. Vlákno miRNA v komplexu s RISC je zachováno a vzniká miRNA-RISC

(miRISC) umlčující komplex, který reaguje s komplementárním úsekem mRNA (Gregory *et al.*, 2005).



Obr. 3 Biogeneze miRNA (převzato a upraveno Treiber *et al.*, 2019*)

MiRNA v živočišných buňkách využívá k vazbě na komplementární mRNA tzv. jádrovou (angl. seed) sekvenci. Je to úsek mezi druhým a sedmým nukleotidem na 5' konci miRNA, který se nejčastěji váže na 3' nepřekládanou oblast (3'UTR; 3'untranslated region) mRNA. V této části mRNA je inhibice translace nejúčinnější, pokud se zde vyskytují konzervované sekvence či AU bohaté úseky, efektivita inhibice se zvyšuje. Méně častá je vazba miRNA do 5'UTR nebo otevřeného čtecího rámce (Ørom *et al.*, 2008; Bartel, 2009*).

Komplex miRISC může cílovou mRNA degradovat přenesením do multivezikulárních P-tělísek či pouze inhibovat translaci. Umlčení translace probíhá

několika různými způsoby. Jedním z nich je kompetice s eukaryotickými iniciačními translačními faktory jako je eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) či komplex eIF6/60S (eukaryotic translation initiation factor 6), jejichž vyvázání zamezuje složení ribozomů. Může také dojít k interakci miRISC s 5' čepičkou, což vede ke vzniku konformace mRNA nevhodné pro translaci (Chendrimada *et al.*, 2007; Mathonnet *et al.*, 2007). Inhibice může probíhat také v elongační fázi translace, kdy dochází za působení miRISC k rozpadu polyribosomů (Petersen *et al.*, 2006).

4.3 Deregulace exprese hostitelských miRNA u HPV-asociovaných malignit

Dnes je známo, že až 60 % lidských genů je regulováno pomocí miRNA (Friedman *et al.*, 2009). Změna jejich exprese může vést ke vzniku některých onemocnění včetně malignit. O miRNA se uvažuje jako o potenciálních biomarkerech rakoviny, například snížená exprese miR-15 a miR-16 je charakteristická pro onemocnění chronickou lymfocytární leukémií (Calin *et al.*, 2002). Množství miRNA a specifita expresních profilů se však liší v závislosti na anatomické lokalizaci, typu tkáně a jejím nádorovém charakteru. Některé miRNA, jako je rodina miR-29, podporují nádorové bujení v karcinomech prsu, avšak v nádorech plic mají opačné, tedy tumor-supresivní účinky (Gebeshuber *et al.*, 2009). Stejný fenomén můžeme vidět u miR-23b, jejíž ztráta vede u renálního karcinomu ke snížené invazivitě buněk, naopak u karcinomu močového měchýře snížení její exprese vede ke zvýšení migrační aktivity buněk (Zaman *et al.*, 2012; Majid *et al.*, 2013).

K deregulaci exprese miRNA může docházet několika různými mechanismy, jedním z nich je jednonukleotidový polymorfismus (SNP, single nucleotide polymorphism), který může být lokalizován v samotné jádrové sekvenci genu pro miRNA, pri-miRNA, pre-miRNA či maturované miRNA. Změna nukleotidu může nastat také v upstream a downstream regulačních regionech genů miRNA (Pipan *et al.*, 2015*). SNP se nemusí vyskytovat jen v genech miRNA, ale mohou se také nacházet v jejich cílovém vazebném místě (Chin *et al.*, 2009). Stejně tak může docházet k delecím několika párů bází, které zasahují do genů miRNA či jejich cílových sekvencí (Calin *et al.*, 2002).

Epigenetické modifikace jsou dalším mechanismem snížení exprese genů kódujících miRNA. Jedná se především o DNA metylaci CpG (cytosin-fostát-guanin) ostrůvků

a modifikaci histonů. Některé geny pro miRNA mohou být epigeneticky umlčovány u řady nádorů nebo jen u nádorů určité anatomické lokalizace. Například snížená exprese miR-200 u karcinomu prsu je zapříčiněna jak DNA metylací, tak modifikacemi histonů (Lim *et al.*, 2009). Dalším příkladem je miR-34, která je ve všech zdravých buňkách exprimována, ale v nádorových buňkách je její exprese umlčena DNA metylací. Tato miRNA má tumor-supresivní charakter a patří mezi slibné terapeutické cíle (Strmsek *et al.*, 2014).

K aberantní expresi miRNA může dojít také při samotné biogenezi, v důsledku sekvenční změny v genech sestříhových aparátů (Drosha a Dicer), či poškozením genů kódujících miRNA, které regulují štěpná místa aparátů. Následně dochází ke změně rychlosti štěpení vlásenek a štěpného vzorce a k častější chybovosti aparátů (Rakheja *et al.*, 2014; Rupaimoole *et al.*, 2016).

Papilomaviry nekódují své vlastní miRNA, dokáží však svými proteiny ovlivnit miRNA hostitelské buňky. Geny miRNA jsou často cílem transkripčních faktorů c-myc, p53 a E2F, které jsou regulovány virovými proteiny E6 a E7. Například faktor c-myc indukuje expresi miR-7 a naopak snižuje expresi miR-34a a miR-146a (Chang *et al.*, 2009). Tumor-supresorový protein p53, který je degradován proteinem E6, zastává funkci transkripčního faktoru pro miR-34a, miR-26a a miR-23a. Množství těchto miRNA v přítomnosti viru klesá (Chang *et al.*, 2009).

4.3.1 MiRNA u HPV asociovaných nádorů cervixu

Nádory cervixu (hrdla děložního) patří mezi nejstudovanější typ karcinomů způsobených papilomaviry. Téměř stoprocentní HPV pozitivita, stále vysoká incidence a existence dobře diagnostikovatelných premaligních stádií z těchto nádorů vytváří ideální model pro studium kancerogeneze vyvolané těmito viry, a tedy i pro studium účasti miRNA v procesu malignizace.

Studie ukázaly, že expresní profil miRNA se mění se závažností onemocnění (od premaligních lézí stádia 1 až 3 k invazivním karcinomům). Dosud se však nepodařilo

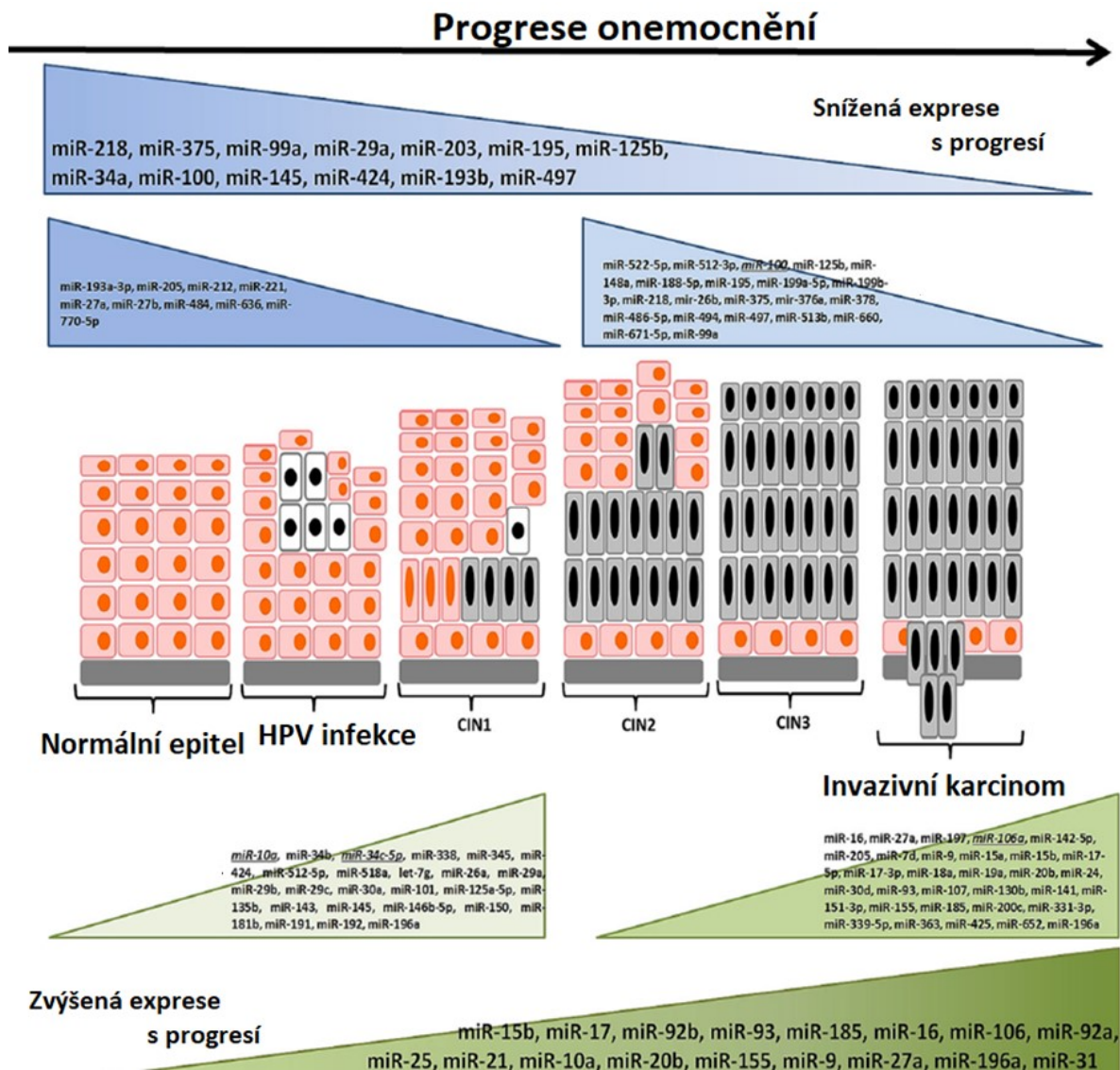
identifikovat panel miRNA, který by byl pro tento typ nádorů klinicky využitelný. Důvodem je malý překryv v nalezených diferenciólně exprimovaných miRNA mezi studiemi a také to, že řada z identifikovaných miRNA není specifická pouze pro tento typ HPV asociovaného nádoru (Obr. 4) (Li *et al.*, 2010; Gocze *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2015), např. miR-21 a miR-34 (Volinia *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2012; Strmsek *et al.*, 2014; Gocze *et al.*, 2015). Přesto bylo v několika nezávislých studiích shodně identifikováno několik diferenciólně exprimovaných miRNA specifických pro nádory této anatomické lokalizace a tyto miRNA by mohly mít význam jako potenciální biomarkery tohoto onemocnění, ale je třeba v dalším výzkumu ověřit především jejich funkci a cílové geny (Tab. 1).

Regulace buněčných miRNA v nádorech způsobených papilomavirou infekcí, vlivem onkoproteinů E6, E7 a E5 byla prokázána v řadě studií. Martinez a kol ukázal, že protein E6 snižuje transkripci miR-218, v důsledku čehož dochází k expresi onkogenu LAMB3 (laminin subunit beta-3) (Martinez *et al.*, 2008). Protein E6 dále snižuje expresi např. miR-34a a miR-23b, které působí v buňkách tumor-supresivně a jejich degradace vede ke zvýšení proliferace a motility buněk (Wang *et al.*, 2009; Au Yeung *et al.*, 2011). Naopak exprese onkogenní miR-27b je pozitivně regulována působením onkoproteinu E7 (Au Yeung *et al.*, 2011). Časný onkoprotein E5 inhibuje tumor-supresorovou miR-196a, jejíž cílem je faktor HOXB8 (homeobox B8), který podporuje proliferaci buněk a zabraňuje apoptóze (Liu *et al.*, 2015).

Tab. 1 Přehled nejfrekventovanějších diferenciálně exprimovaných miRNA u cervikálního karcinomu.

Zvýšená exprese miRNA		Snížená exprese miRNA	
miR-106a	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)	miR-218	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)
miR-10a	(Cheung <i>et al.</i> , 2012)	miR-100	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-146a	(Liu <i>et al.</i> , 2014)	miR-125b	(Wilting <i>et al.</i> , 2013)
miR-155	(Wilting <i>et al.</i> , 2013)	miR-145	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-15b	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)	miR-195	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-185	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)	miR-203	(Gocze <i>et al.</i> , 2015)
miR-20a	(Liu <i>et al.</i> , 2015)	miR-23b	(Au Yeung <i>et al.</i> , 2011)
miR-20b	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)	miR-29a	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-21	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)	miR-342-3p	(Li <i>et al.</i> , 2014)
miR-25	(Wilting <i>et al.</i> , 2013)	miR-34a	(Gocze <i>et al.</i> , 2015)
miR-31	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)	miR-375	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-9	(Zeng <i>et al.</i> , 2015)	miR-424	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)
miR-92a	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)	miR-497	(Wilting <i>et al.</i> , 2013)
miR-92b	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)	miR-99a	(Yang Li <i>et al.</i> , 2011)

U některých genů pro miRNA byly identifikované SNP, které snižují riziko vzniku cervikálního karcinomu. Je to například polymorfismus rs11134527 pri-miR-218, kde genotyp GG snižuje riziko vzniku karcinomu na rozdíl od genotypu AA nebo AG (Zhou *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2013). Stejně tak polymorfismus rs531564 (C>G) miR-124 je spojován s redukcí rizika cervikálního karcinomu (Wu & Zhang, 2014).



Obr. 4 Změna exprese miRNA v závislosti na stádiu HPV lézí (převzato a upraveno Pardini *et al.*, 2018*).

4.3.2 MiRNA u HPV asociovaných nádorů hlavy a krku

Spinocelulární nádory hlavy a krku (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) jsou celosvětově šestým nejčastějším nádorovým onemocněním (Parkin *et al.*, 2002). Po diagnóze se více než pěti let dožívá pouze 50 % pacientů. Nejčastějším důvodem špatné prognózy bývá pozdní fáze identifikace onemocnění (Fakhry *et al.*, 2019). Kauzální příčinou těchto nádorů je nadměrné užívání tabákových či alkoholických výrobků nebo papilomavirová infekce. Mezi nádory hlavy a krku patří nejčastěji karcinomy dlaždicových buněk ústní dutiny, hltanu a hrtanu. Pacienti s HNSCC pozitivními na HPV mají lepší prognózu než ti s nádory této oblasti negativní na HPV. Odlišnosti nádorů HNSCC různé etiologie vedly pak ke změně klasifikace orofaryngeálních nádorů, kde je nyní již zohledněn i HPV status (8. vydání TNM (tumor-nodes-metastases)) (O'Sullivan *et al.*, 2016). Právě z důvodu lepší prognózy pacientů s HPV asociovanými karcinomy se intenzivně hledají nové diagnostické a terapeutické cíle, jako jsou např. miRNA.

Avšak ještě výrazněji, než u karcinomu cervixu jsou studie analyzující expresní profily miRNA u nádorů hlavy a krku velmi diskrepantní, detekované diferenciálně exprimované miRNA se mezi nimi nepřekrývají. Jedním z faktorů nepřesnosti studií může být heterogenita těchto nádorů. Ačkoliv starší studie neprokázaly významné rozdíly mezi expresí miRNA v ústní dutině, orofaryngu a hypofaryngeální oblasti (Hui *et al.*, 2010), modernější metody sekvenování již ukazují rozdíly v diferenciální expresi miRNA mezi těmito lokalizacemi (Božinović *et al.*, 2019). V mnoha dřívějších studiích také nebyl zohledněn HPV status či aktivní virová infekce. Dalším faktorem, který ovlivňuje heterogenitu výstupů studií je typ použitých klinických materiálů a postup jejich zpracování. Většina starších studií vzájemně porovnává profily miRNA z čerstvě zmražené tkáně (FF, fresh frozen), tkáně fixované formalínem zalité v parafínu (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) a buněčných linií (Lajer *et al.*, 2012). Avšak použití různých klinických materiálů, FF vs FFPE, ukázalo pouze 27 – 38 % překryv mezi detekovanými diferenciálně exprimovanými miRNA. V této studii byly také prokázány variace v případě použití různých typů normalizace dat (Vojtechova *et al.*, 2017). Studie založené na porovnání expresních profilů HNSCC se zaměřením na HPV status můžeme rozdělit na dva typy a to na ty, které srovnávají nádory pozitivní na HPV versus nádory negativní na HPV (Gao *et al.*, 2013; Mirghani *et al.*, 2016) a ty, které porovnávají nádory

pozitivní na HPV se zdravou tkání stejné lokalizace a následně tvoří překryv expresních profilů (Lajer *et al.*, 2011; Hui *et al.*, 2013; Božinović *et al.*, 2019).

Gao a kol. ve své studii použil FFPE vzorky orofaryngeálních karcinomů a detekoval pět miRNA specifických pro karcinomy pozitivní na HPV: miR-9, miR-31, miR-223, miR-155 a miR-18a (Gao *et al.*, 2013). Stejně srovnání za použití FF vzorků provedl také Mirghani a kol. (Mirghani *et al.*, 2016). Diferenciálně exprimované miRNA zjištěné Mirghani a kol. nevykazují žádný překryv s ostatními studii.

Ve studiích Lajer a kol., Božinović a kol. a Vojtěchová a kol. byl nalezen překryv ve dvou miRNA, a to miR-145 a miR-143 (Lajer *et al.*, 2011; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). U těchto miRNA se ukázalo, že regulují expresi Aktivinu A a jsou označovány jako prognostický znak u orálního dlaždicobuněčného karcinomu. Bylo prokázáno, že jejich snížená exprese vede ke zvýšené proliferaci a migraci buněk (Bufalino *et al.*, 2015).

4.3.3 MiRNA u vulvárních HPV asociovaných nádorů

Nádory vulvy tvoří 4% z gynekologických malignit žen. Incidence těchto nádorů vzrostla, za posledních 27 let o 20% (Judson *et al.*, 2006). Pouze část vulvárních karcinomů (25 %) je vyvolána infekcí vysoce-rizikovými papilomaviry (de Martel *et al.*, 2017). Karcinomy s HPV etiologií se často objevují u mladších pacientek a při časně diagnóze mají lepší prognózu než nádory negativní na HPV, které se také vyskytují spíše u starších žen. Nádory vulvy negativní na HPV vznikají z chronických zánětů anogenitální oblasti, jsou mnohem agresivnější a byly u nich ve srovnání s HPV asociovanými nádory v této anatomické lokalizaci pozorovány daleko častěji mutace proteinu p53 (Kim *et al.*, 1996; Dittmer *et al.*, 2011; Maia *et al.*, 2013).

MiRNA v nádorech vulvy pozitivních na HPV byly doposud zkoumány pouze v jedné studii. Maia a kol. použili k analýze FFPE řezy nádorové a zdravé tkáně vulvy. Při samotné analýze srovnávali expresní profily miRNA nádorů pozitivních na HPV s nádory negativními na HPV. Výsledkem bylo 25 diferenciálně exprimovaných miRNA v nádorech pozitivních na přítomnost papilomaviru (Tab. 2). Zdravou tkáň použili též k porovnání expresních profilů mezi nádorovou tkání a zdravou tkání bez ohledu na HPV status a v nádorové tkáni našli 79 miRNA se sníženou expresí (Maia *et al.*, 2013).

Tab. 2 Diferenciálně exprimované miRNA u vulvárních karcinomů pozitivních na HPV ve srovnání s karcinomy vulvy negativními na HPV (Maia *et al.*, 2013).

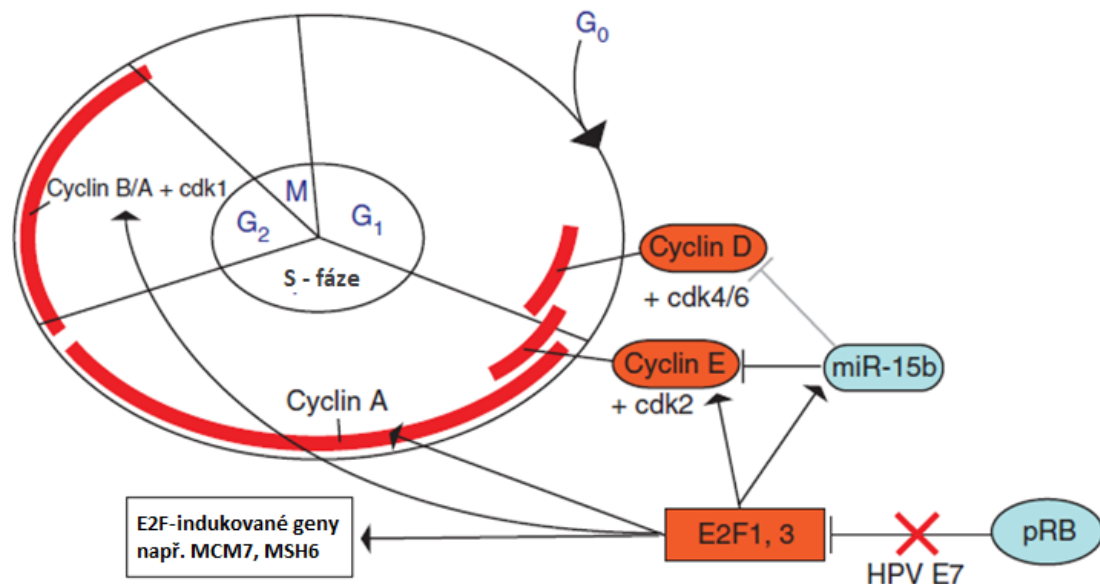
HPV+ karcinomy vulvy	
miRNA se sníženou expresí	miRNA se zvýšenou expresí
miR-1291	miR-1274B
miR-342-3p	miR-142
RNU44	miR-21
miR-193-5p	miR-708
miR-29c	miR-16
miR-106b	miR-660
miR-22	miR-29c
miR-365	miR-1267
miR-151-5p	miR-454
miR-144	miR-186
miR-125b-1	
miR-519b-3p	
miR-26b	
miR-19b	
miR-1254	

4.3.4 MiRNA u análních HPV asociovaných nádorů

Podobně jako karcinom cervixu, je anální karcinom také téměř vždy asociovaný s HPV. Jeho incidence je sice nízká, ale jen v USA se mezi rokem 1975 a 2012 více než zdvojnásobila a to jak u mužů, tak i u žen. Předpokládá se, že důvodem je změna sexuálního chování populace (Stier *et al.*, 2016*). Nejrizikovější skupiny pro toto onemocnění jsou ženy po prodělaném karcinomu cervixu, HIV pozitivní pacienti a muži mající sex s muži (Melbye & Sprogel 1991; Silverberg *et al.*, 2012).

Jen jedna studie se dosud zabývala expresními profily miRNA těchto nádorů. Myklebust a kol. analyzovali anální karcinomy na základě rozdělení vzorků do dvou skupin podle hladiny exprese pěti genů závislých na E2F faktoru (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *MCM7* a *MSH6*). Skupina č. 1 měla sníženou expresi a skupina č. 2 zvýšenou expresi těchto genů, s čímž korelovalo také množstvím E7 proteinu stejně jako množství

miR-15b. Inhibicí E7 mRNA se snížilo množství miR-15b, cyklinu A, cyklinu B1 a proteinu MCM7. Buňky transfekované větším množstvím miR-15b začaly stagnovat v G₀/G₁ fázi buněčného cyklu (Obr. 5), což ukazuje, že miR-15b negativní zpětnou vazbou reguluje nadměrnou buněčnou proliferaci (Myklebust *et al.*, 2011).



Obr. 5 Role miR-15b v regulaci buněčného cyklu (převzato Myklebust *et al.*, 2011).

4.3.5 HPV-core miRNA

Jak již bylo dříve zmíněno, expresi miRNA může ovlivnit etiologie nádoru. Mnoho recentních studií již při zkoumání diferenciální exprese miRNA v dlaždicobuněčných karcinomech rozlišuje HPV status nádoru. Nicméně doposud se pouze dvě z publikovaných studií pokusily identifikovat tzv. „HPV-core miRNA“, tj. miRNA společné pro nádory pozitivní na HPV v různých anatomických lokalizacích. Lajer a kol. provedli porovnání exprese miRNA mezi nádory cervixu a orofaryngu (pozitivních na HPV a negativních na HPV) a identifikovali 14 diferenciálně exprimovaných miRNA v nádorech pozitivních na HPV. Srovnání provedli vždy s referenční zdravou tkání totožné anatomické lokalizace (Lajer *et al.*, 2012). Stejným způsobem byly ve studii Vojtěchová a kol. porovnány expresní profily nádorů hlavy a krku a karcinomů cervixu (Vojtechova *et al.*, 2016). Vojtěchová a kol. identifikovala

pět miRNA diferenciálně exprimovaných v nádorech pozitivních na HPV v těchto dvou lokalizacích (Vojtechova *et al.*, 2016). Jednou z těchto miRNA byla miR-9, která byla již v několika nezávislých studiích označena jako miRNA společná pro nádory vyvolané papilomaviry (Hui *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). Její nadměrná exprese vede ke zvýšení motility buněk, což může přispívat k tvorbě metastáz (Liu *et al.*, 2014). Mezi studii Vojtěchové a kol. a Lajer a kol. nebyl však nalezen žádný překryv v diferenciálně exprimovaných miRNA.

4.4 Diagnostické a terapeutické využití miRNA u HPV

MiRNA mohou být významnými biomarkery, neboť to jsou malé molekuly detekovatelné ve většině tělních tekutin, například ve slinách a moči. Jsou též velmi stabilní, proto je možné je detekovat i v archivních materiálech, jakými jsou např. FFPE řezy. Pomocí miRNA je již možné odlišit nádorovou tkáň od zdravé tkáně a určit subtyp nádoru, případně lokalizaci primárního karcinomu (Varadhachary *et al.*, 2011). MiRNA se také ukazují být důležitými prognostickými znaky (Blenkiron *et al.*, 2007).

Z hlediska miRNA nejintenzivněji studovaný maligní nádor vyvolaný papilomaviry je karcinom cervixu. I přes to, že bylo a je publikováno mnoho studií zaměřených na stanovení expresních profilů miRNA těchto nádorů, stále není definován jednotný diagnostický panel miRNA. Čtyři miRNA v krevním séru: miR-9, miR-10a, miR-20a a miR-196a, byly určeny ve studii Xin a kol. jako potenciální miRNA panel pro cervikální intraepiteliální neoplázie (Xin *et al.*, 2016). U pacientek s cervikálním karcinomem byly v krevním séru v porovnání se zdravými pacientkami nalezeny vysoké hladiny miR-20a a miR-203 (Zhao *et al.*, 2013). Stejně tak byla prokázána spojitost mezi hladinou miR-218 v krevním séru a rozvojem metastáz karcinomu cervixu (Yu *et al.*, 2012). Liu a kol. identifikovali miR-21 a miR-146a v exozomech z cervikovaginálního výplachu. Uvádí, že hladiny těchto miRNA jsou významně vyšší u pacientů s cervikálním karcinomem pozitivním na HPV (Liu *et al.*, 2014). V tkáních identifikované miRNA se ale napříč studii liší a jsou známy desítky miRNA, které se jeví jako deregulované v těchto nádorech (Kap. 4.3.1).

MiRNA také mohou u pacientek s nádory cervixu predikovat efektivitu nádorové terapie a umožnit tak individualizovanou léčbu. Snížená hladina miR-181a a miR-145

koreluje s radiorezistencí pacientek s karcinomem cervixu a ukazuje na horší prognózu (Ke *et al.*, 2013; Ye *et al.*, 2015).

U nádorů hlavy a krku se stále objevuje až 900 000 nových případů ročně (Monsjou *et al.*, 2013). Heterogenita těchto nádorů vyžaduje časnou diagnózu a přesné určení jejich subtypů. V nedávné studii Wan a kol. navrhli několik diagnostických panelů miRNA detekovatelných ve slinách. Prvním panelem oddělili HPV pozitivní pacienty od negativních zdravých kontrol, dalším následně HPV negativní pacienty od zdravých kontrol (Tab. 3). Také se jim podařilo identifikovat panel miRNA charakteristický pro časně stádium (bez metastáz) HNSCC pozitivních na HPV (Wan *et al.*, 2017).

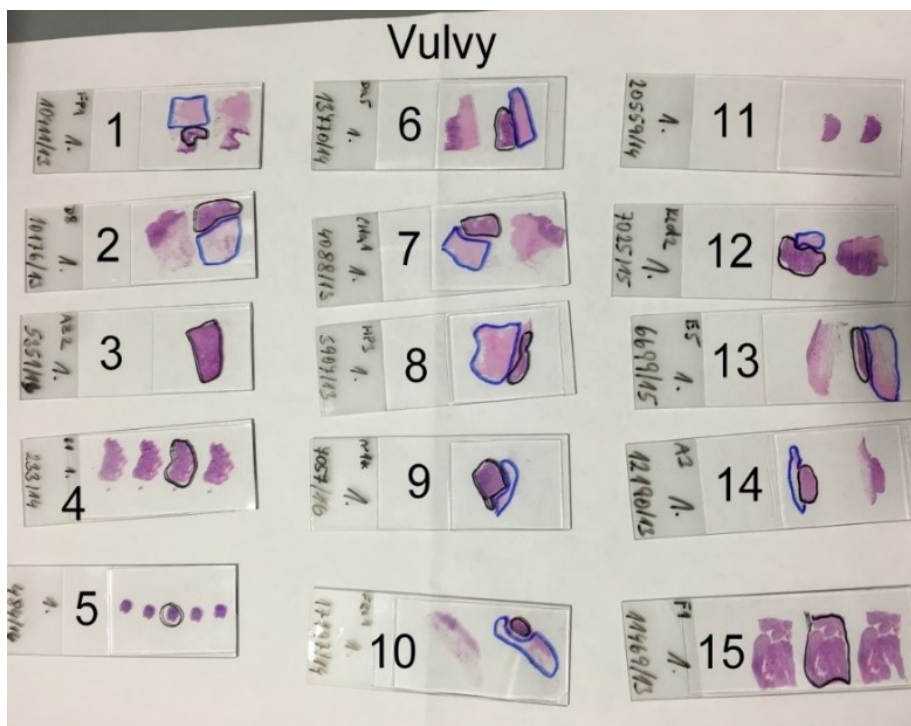
Tab. 3 Panel miRNA pro určení pacientů pozitivních na HPV, pacientů negativních na HPV a časněho stádia HNSCC pozitivní na HPV ze vzorku slin.

HPV+ vs zdravé kontroly	miR-9	miR-134	miR-196b	miR-210	miR-455	-
HPV- vs zdravé kontroly	miR-9	miR-127	miR-134	miR-191	miR-222	miR-455
Časně stádium HNSCC	miR-9	miR-127	miR-196a	miR-196b	miR-210	miR-222

5 Materiál a metody

5.1 Vzorky a jejich příprava

Ve studii byly použity vzorky nádorů patrových tonsil a nemaligní tkáně ze stejné anatomické lokalizace získané v průběhu předešlých studií z Kliniky otolaryngologie a chirurgie hlavy a krku 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Fakultní nemocnice (FN) Motol. Dále byly zařazeny vzorky dlaždicobuněčného karcinomu vulvy, cervixu, anu a zdravých tkání stejné anatomické lokalizace vybrané z depositáře Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol a Ústavu patologie FN Královské Vinohrady (KV). Všichni pacienti, kteří byli zařazeni do studií, podepsali informovaný souhlas a všechny studie byly schváleny etickou komisí FN Motol a FN KV. Má práce navazuje na studii miRNA expresních profilů u nádorů hlavy a krku, provedenou na oddělení imunologie v Ústavu hematologie a krevní transfúze v Praze (Vojtechova *et al.*, 2016).



Obr. 6: Patnáct vzorků FFPE 10 µm řezů vulvy barvených hematoxylin-eosinem. Nemaligní tkáň ohraničena modře, nádorová tkáň ohraničena černě.

Rutinní zpracování tkání po odběru, tedy jejich fixace a zalití do parafínu, bylo prováděno v příslušných odděleních patologie. Z připravených vzorků byly patologem

vyhotoveny řezy. Vzorky obsahují jak nádorovou, tak zdravou tkáň, která byla odebrána spolu s nádorem. Patolog připravil ze všech výše zmíněných anatomických lokalizací řezy tkáně o tloušťce 10 μm na podložní sklíčka, vždy pět po sobě následujících řezů. Pátý řez byl barven hematoxylin-eosinem (HE) (Obr. 6) a sloužil pro ověření přítomnosti nádorové tkáně, a dále jako vzor pro přesnou makrodisekci nádorových i nenádorových oblastí. Ze čtyř řezů jsem vyznačenou oblast tkáně sterilním skalpelem kvantitativně seškrábala a přenesla do jedné 2 ml sterilní zkumavky. Z části vzorků, které obsahovaly pouze nádorovou či pouze zdravou tkáň, patolog připravil do 2 ml zkumavek 10 řezů daného vzorku o síle 10 μm . Vzorky tonsilárních karcinomů a zdravé tkáně tonsil, které reprezentují nádory hlavy a krku, byly zpracovány v předchozích studiích a já jsem měla k dispozici již izolované nukleové kyseliny.

5.2 Izolace nukleových kyselin a kontrola kvality a kvantity

Pro izolaci DNA a RNA jsem využila komerční kity. Z počátku jsem pro izolaci vulvární tkáně použila RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, USA), který byl již dříve v naší laboratoři používán pro izolaci nukleových kyselin z parafinových řezů fixovaných tkání patrových tonsil. Avšak při zpracování vzorků tímto kitem jsem získala velmi nízký výtěžek DNA i RNA, proto jsem musela optimalizovat proces izolace nukleových kyselin pomocí jiných komerčních souprav. Porovnala jsem izolace pomocí *TRIzol*™ Reagent (Invitrogen, USA) s použitím firemního protokolu a soupravy AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit a AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (obě Qiagen, USA) podle firemního protokolu. Při metodě *TRIzol*™ Reagent jsem získala vyšší výtěžek RNA i DNA, ale kvůli přítomnosti fenolu měly vzorky nevyhovující čistotu pro následné analýzy. Nejlepšího výsledku izolace jsem dosáhla pomocí AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, USA) podle modifikovaného protokolu, který umožňuje izolaci genomové DNA a celkové RNA včetně miRNA z FFPE tkáně. Modifikace protokolu spočívá v odstraňování xylenu při deparafinizaci ředící řadou etanolu namísto 100 % etanolu, dále je zkrácena doba inkubace DNA peletu po zlyzování z 2 h na 1 h při 90 °C.

Izolaci kitem AllPrep® DNA/RNA FFPE Kit jsem prováděla vždy maximálně na devíti vzorcích a jako desátý vzorek jsem vždy přidala negativní kontrolu izolace.

Ke každému vzorku jsem přidala 1 ml 100% xylenu k rozpuštění parafínu, řádně promíchala a směs jsem nechala inkubovat v termobloku ThermoCell CHB-202 (Bioer, Čína) 3 min při 50 °C. Poté jsem vzorek centrifugovala v odstředivce Eppendorf 5424 (Eppendorf, Německo) 2 min při 18 000×g a xylen jsem opatrně odsála pipetou, tak abych neporušila pelet. Tento postup jsem opakovala dvakrát až čtyřikrát podle množství parafínu ve vzorku, abych kompletně všechen parafín odstranila. Následně jsem k peletu přidala 1 ml 100% etanolu a vzorek opět centrifugovala 2 min při 18 000×g. Opatrně jsem odstranila etanol bez porušení peletu a přidala 1 ml 95% etanolu. Směs jsem řádně promíchala a inkubovala 5 min při pokojové teplotě a poté centrifugovala 2 min při 18 000×g a znovu odstranila etanol. Stejný postup jsem opakovala znovu se 70% etanolem. Otevřenou zkumavku jsem umístila do termobloku, předehřátého na 37 °C, na 15 min, aby se pelet zcela vysušil.

K vysušenému peletu jsem přidala 150 µl lyzačního pufru PKD a pelet resuspendovala. Přidala jsem 10 µl proteinázy K. Po řádném promíchání jsem vzorek inkubovala 15 min při 56 °C a poté 3 min na ledu a centrifugovala 15 min na 20 000×g. Supernatant jsem opatrně odebrala do 2 ml zkumavky a pokračovala izolací celkové RNA spolu s miRNA. Pelet jsem uchovala při -20 °C pro následnou izolaci DNA.

Supernatant jsem inkubovala 15 min při 80 °C. Poté jsem přidala 320 µl pufru RLT a 1 120 µl 100% etanolu. Po promíchání směsi jsem vždy nanesla 700 µl vzorku na kolonku RNeasy® MinElute® Spin Columns a centrifugovala 30 s při 8 000×g. Roztok ze sběrné zkumavky jsem slila do odpadní kádinky a znovu nanesla 700 µl vzorku na kolonku, takto jsem postupovala, dokud jsem nepřefiltrovala všechen vzorek. Následně jsem kolonku promyla 350 µl pufru FRN a znovu centrifugovala 30 s při 8 000×g. Pro každý vzorek jsem si připravila 80 µl DNázové směsi (70 µl pufru RDD a 10 µl DNase I/vzorek), nanesla na kolonku a nechala 15 min inkubovat při pokojové teplotě. Poté jsem na kolonku přidala 500 µl pufru FRN a centrifugovala 30 s při 8 000×g, pro lepší promytí kolonky jsem přefiltrovaný roztok znovu nanesla na filtr a opakovala centrifugaci. Na kolonku jsem dvakrát pipetovala 500 µl pufru RPE a centrifugovala 30 s při 8 000×g. Následně jsem umístila kolonku s otevřeným víčkem do čisté sběrné zkumavky a vysušila centrifugací 5 min při 18 000×g. Kolonku jsem přenesla do 1,5 ml zkumavky, nanesla 30 µl vody prosté RNáz na střed filtru a inkubovala 1 minutu při pokojové teplotě. Závěrečná centrifugace pro uvolnění celkové RNA z filtru kolonky, probíhala 1 min při 20 000×g. Koncentraci a čistotu RNA jsem měřila pomocí spektrofotometru NanoDrop™

2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky RNA jsem popsala a uložila do mrazáku na -80 °C.

Při izolaci DNA jsem ke každému vzorku přidávala 180 µl lyzačního pufru ATL a 40 µl proteinázy K nebo 360 µl lyzačního pufru ATL a 40 µl proteinázy K podle velikosti velikosti peletu, který jsem následně důkladně resuspendovala. Poté jsem vzorky inkubovala v třepacím termobloku ThermoCell Mixing Block MB-102 (Bioer, Čína) přes noc při teplotě 56 °C. Pokud vzorky nebyly zcela zlyzované, přidala jsem 20 µl proteinázy K a nechala inkubovat v třepacím termobloku další 1 hodinu při 56 °C do úplné lýze. Následně jsem víčka zkumavek zajistila parafilmem Parafilm M (Heathrow Scientific, UK) a inkubovala v termobloku ThermoCell CHB-202 (Bioer, Čína) 1 hodinu při 90 °C. Parafilm jsem opatrně odstranila pomocí sterilní buničité vaty a přidala 200 µl pufru AL a 200 µl 100% etanolu, případně 400 µl pufru AL a 400 µl 100% etanolu a řádně promíchala. Do kolonky QIAamp® MinElute Spin jsem napipetovala 600 µl vzorku a centrifugovala 1 min při 8 000×g, postup jsem opakovala, dokud jsem nepřefiltrovala všechn vzorek. Kolonku jsem postupně promyla 700 µl promývacího pufru AW1 a centrifugovala 30 s při 8 000×g, 700 µl pufru AW2 a centrifugovala 30 s při 8 000×g a 700 µl 100% etanolu. Následně jsem kolonku s otevřeným víčkem přenesla do nové sběrné zkumavky a centrifugovala 5 min při 14 000×g pro úplné odstranění etanolu. DNA jsem eluovala 30 µl elučního pufru ATE do čisté 2 ml zkumavky po 5 min inkubaci při pokojové teplotě centrifugací 1 min při 14 000×g. Koncentraci a čistotu DNA jsem měřila na spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky jsem řádně popsala a uložila do mrazáku na -20 °C.

5.2.1 Určení délek fragmentů DNA

Je známo, že při fixaci tkáně formalínem a zalití do parafínu dochází k fragmentaci nukleových kyselin (Bonin *et al.*, 2003; Vojtechova *et al.*, 2017). Tato degradace může být způsobena samotným chemickým působením formalínu na DNA či podmínkami fixace jako je pH, teplota a délka fixace. Pro ověření velikosti fragmentů DNA ve zpracovaných vzorcích, jsem provedla multiplexní polymerázovou řetězovou reakci (PCR, polymerase chain reaction) s primery specifickými pro 100 pb, 200 pb, 300 pb a 400 pb dlouhé úseky referenčního genu GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Tab. 4) (Beers *et al.* 2006). V jedné reakci o objemu 20 μ l jsem použila 1 \times koncentrovaný pufr AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM směsi nukleotidů, 3mM roztok MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,133 μ M směs primerů GAPDH, 0,5 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 9,9 μ l vody prosté RNáz a 20 ng DNA v 5 μ l vody prosté RNáz. Vždy jsem zařazovala negativní kontrolu PCR, u které jsem místo vzorku DNA přidala vodu prostou RNáz, a také pozitivní kontrolu, kde jsem použila DNA vyizolovanou z buněčné linie HaCaT (Kap. 5.8.1). Reakce probíhala v cykleru Peltier Thermal Cycler 200 (MJ-Research, Kanada), který byl používán ke všem následujícím PCR reakcím. Podmínky reakce byly následující: iniciační denaturace 10 min při 95 °C, následovalo 34 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 1 min, nasedání primerů 1 min při 56 °C a prodlužování řetězce 3 minuty při 72 °C. Konečná fáze extenze probíhala 7 min při 72 °C.

Produkty amplifikační reakce jsem analyzovala na 3% agarózovém gelu, pro jehož přípravu jsem použila 40 ml pufru Tris-borát-EDTA (TBE), ve kterém jsem rozpustila 1,2 g agarózy NuSieve™ 3:1 (Lonza, Švýcarsko) a 2 μ l barviva GelRed™ (Biotium, USA). Na gel jsem nanášela 10 μ l vzorku spolu se 3 μ l 6 \times Loading pufru (Thermo Fisher Scientific, USA), jako žebříček jsem použila GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Elektroforéza probíhala při napětí 110 V po dobu 50 min. K vizualizaci DNA jsem použila systém InGenius 3 (Syngene, UK).

Tab. 4 Přehled použitých primerů. F – forward, R – reverse.

Cílový gen	Jméno primeru	Sekvence 5' → 3'	Směr	Délka amplikonu
GAPDH	GAPDH 100	GTTCCAATATGATTCCACCC	F	DNA 100 pb
	GAPDH 100	CTCCTGGAAGATGGTGATGG	R	
	GAPDH 200	AGGTGGAGCGAGGCTAGC	F	DNA 200 pb
	GAPDH 200	TTTTGCGGTGGAAATGTCCT	R	
	GAPDH 300	AGGTGAGACATTCTTGCTGG	F	DNA 300 pb
	GAPDH 300	TCCACTAACCAGTCAGCGTC	R	
	GAPDH 400	ACAGTCCATGCCATCACTGC	F	DNA 400 pb
	GAPDH 400	GCTTGACAAAGTGGTCGTTG	R	
L1	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	F	DNA 150 pb
	BSGP5+ -2	TTTGTTACTGTTGTIGATACTAC	F	
	BSGP5+ -3	TTTGTTACTGTTGTIGATACCAC	F	
	BSGP5+ -4	TTTGTTACTTGTGTIGATACTAC	F	
	BSGP5+ -5	TTTTTAACTGTTGTIGATACTAC	F	
	BSGP5+ -6	TTTGTTACTGTGGTAGACACTAC	F	
	BSGP5+ -7	TTTGTTACAGTIGTAGACACTAC	F	
	BSGP5+ -8	TTTGTTACAGTIGTAGATACCAC	F	
	BSGP5+ -9	TTTGTTACTGTGGTAGATACCAC	F	
	GP6+bio	GAAAAATAAACTGTAAATCATATT C	R	
	Bio-BSGP6+ -b	GAAAAATAAATTGTAAATCATACT C	R	
	Bio-BSGP6+ -c	GAAAAATAAATTGCAATTCATATT C	R	
E6 HPV16	E6fwSmeets	TACTGCGACGTGAGGTGTA	F	DNA 248 pb cDNA 86 pb
	E6rvSmeets	GGAATCTTTGCTTTTGTCC	R	
β-globin	PC03	ACACAACGTGTTCCTAGC	F	DNA/cDNA 110 pb
	PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	R	
HPRT	HPRT-F	CACTGGCAAACAATGCAGACT	F	cDNA 117 pb
	HPRT-R	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCG T	R	

5.3 Určení genotypu papilomaviru

Pro určení genotypu papilomavirů ve vzorcích jsem použila PCR s následnou reverzní membránovou hybridizací (RLB, reverse line blot hybridization), kterou je možné identifikovat 37 typů HPV (HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV26, HPV31, HPV33, HPV34, HPV35, HPV39, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV54, HPV56, HPV57, HPV58, HPV59, HPV61, HPV66, HPV68, HPV70, HPV71, HPV72, HPV73, HPV81, HPV82, HPV83, HPV84, HPV89). PCR jsem provedla se směsí primerů GP5+ a GP6+bio (značen biotinem na 5'-konci) amplifikujícími fragment genu L1 o velikosti 150 pb (Tab. 4) (Schmitt *et al.*, 2008). Hybridizace PCR produktů značených biotinem probíhá na Biotyne C membráně (Pall Bio-Support, USA) s kovalentně navázanými typově specifickými próby. Hybridizované amplikony jsou detekovány pomocí avidin-peroxidázy metodou chemoluminiscence (Brule *et al.* 2002; Schmitt *et al.* 2006).

PCR reakce o objemu 50 μ l se skládala z 1 \times koncentrovaného pufru AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 0,2mM směsi nukleotidů, 3,5mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA), 10 pmol GP5+ směsi primerů, 20 pmol GP6+bio primerů, 1 U DNA polymerázy AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific, USA), 30,8 μ l vody prosté RNáz a 200 ng DNA ve 4 μ l vody prosté RNáz. Ke každé reakci jsem přidala negativní kontrolu, u které jsem nahradila vzorek DNA vodou prostou RNáz a dále jsem přidávala 4 pozitivní kontroly: DNA izolovanou z buněčné linie SiHa naředěnou na 32, 160 a 800 kopií HPV16 na reakci a plazmidovou DNA se zaklonovaným HPV. Reakce probíhala za podmínek: iniciační denaturace při 94 °C po dobu 4 min, následovanou 40 cykly denaturace 20 s při 94 °C, nasedání primerů 30 s při 38 °C a prodlužování řetězce 80 s při 71 °C. Závěrečná fáze extenze probíhala při 71 °C po dobu 4 min. Následně jsem si připravila 3% agarózový gel z 3 g agarózy NuSieveTM 3:1 (Lonza, Švýcarsko), 100 ml pufru TBE a 4 μ l barviva GelRedTM (Biotium, USA). Jako žebříček jsem použila pUC19 DNA štěpený restriční enzymem MspI připravený v naší laboratoři. Elektroforéza proběhla při napětí 150 V po dobu 50 min. K vizualizaci jsem použila UVP EC3 Imaging System (UVP, USA).

Použité zásobní roztoky:

- 20× SSPE (chlorid sodný- dihydrogenfosforečnan sodný-EDTA):
3 M NaCl (chlorid sodný) (Penta, ČR) + 0,2 M NaH₂PO₄
(dihydrogenfosforečnan sodný) (Carl Roth, Německo) + 20 mM EDTA
(kyselina ethylendiamintetraoctová) (Duchefa Biochemie, Nizozemí)
- 20% (w/v) SDS (dodecylsírán sodný):
200 g SDS (Carl Roth, Německo) v 1000 ml ultra H₂O

Roztoky pro hybridizaci:

- 1× 100 ml 2× koncentrovaného SSPE, 0,1% (w/v) SDS
- 1× 300 ml 2× koncentrovaného SSPE
- 2× 300 ml 2× koncentrovaného SSPE, 0,5% (w/v) SDS

Produkty PCR jsem si naředila 20× do 200 µl roztoku 2×SSPE, 0,1% SDS. Vše jsem řádně promíchala, denaturovala v termocykleru TC-18H(b) (Bioer, Čína) 10 min při 98 °C a poté jsem zkumavky přenesla na led. Membránu s navázanými próbami jsem nechala inkubovat na kývací plošině ve 100 ml roztoku 2×SSPE, 0,1% SDS 5 min při pokojové teplotě. Poté jsem ji otočenou o 90 stupňů uzavřela do Miniblotteru 45 (Interchim, Francie) a vakuovou odsávačkou odstranila zbylý roztok. Ředěné PCR produkty jsem nanesla po 150 µl do jednotlivých jamek tak, aby v drážkách nevznikaly bubliny. Celý miniblotter jsem inkubovala 60 min při 42 °C v horkovzdušné peci ProBlot 12 (Labnet International, USA), ve které probíhaly všechny následující inkubace ve tmě a s rotací. Vakuovou odsávačkou jsem odstranila vzorky z jamek a membránu přesunula do hybridizační lahve, kde jsem ji dvakrát promyla 150 ml roztoku 2×SSPE, 0,5 % SDS a inkubovala 10 min na 51 °C. Mezitím jsem si připravila roztok z 10 ml 2×SSPE, 0,5 % SDS a 1 µl 2× koncentrovaného streptavidinového konjugátu značeného peroxidázou, ve kterém jsem inkubovala membránu 60 min na 42 °C. Poté jsem membránu 2× promyla nejprve ve 150 ml 2×SSPE, 0,5 % SDS 15 min při 42 ° a následně jsem 2× promývala ve 150 ml 2×SSPE v pídce při pokojové teplotě po dobu 5 min. Do zkumavky jsem si napipetovala 3 ml roztoku A a 3 ml roztoku B z komerčního kitu Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, USA), po promíchání přidala k membráně a inkubovala 5 min při pokojové teplotě. Po vyjmutí membrány z lahve jsem ji opatrně zabalila do fólie Sarogold (Azpack, Velká Británie)

a umístila do kovové vyvolávací kazety. V temné komoře jsem v kazetě exponovala filmy Lumifilm (Sigma-Aldrich, USA) pro detekci chemiluminiscence po dobu 5 s, 30 s a 5 min a poté vložila do vyvolávacího přístroje KODAK Medical-X-ray-processor (Kodak, USA).

5.4 Detekce genu E6 HPV16

V této práci jsem detekovala gen E6 pomocí primerů specifických pro typ HPV16, které amplifikují oblast DNA o velikosti 248 pb (Smeets *et al.*, 2007) (Tab. 4). Amplifikační reakce PCR o objemu 25 μ l se skládala ze směsi 1 \times koncentrovaného pufru Taq (Fermentas, USA), 1,5mM MgCl₂ (Fermentas, USA), 0,5 μ M primerů pro gen E6, 0,2mM směsi nukleotidů, 0,5 U Taq DNA polymerázy (Fermentas, USA), 17,4 μ l vody prosté RNáz a 2 μ l DNA. Vždy jsem přidala negativní kontrolu, kde jsem namísto DNA použila vodu prostou RNáz a pozitivní kontrolu, ve které jsem přidala DNA buněčné linie SiHa (Kap. 5.8.1). Reakce probíhala za podmínek: iniciace denaturace 5 min při 94 °C, 39 cyklů sestávajících se z denaturace 1 min při 94 °C, nasedání primerů 2 min při 55 °C, prodlužování řetězce 2 min při 72 °C. Konečná fáze extenze 3 min při 72 °C. Detekce ampliconů probíhala na 3% agarózovém gelu (Kap. 5.2.1). Elektroforéza proběhla při napětí 110 V po dobu 35 min. Amplicony jsem vizualizovala v systému InGenius 3 (Syngene, UK).

5.5 Průkaz aktivní infekce HPV

Aktivní transkripci HPV16 onkogenů lze potvrdit dvěma způsoby. První metodou je stanovení přítomnosti mRNA E6. Dále, jako nepřímý marker, slouží detekce proteinu p16, který musí být detekován spolu s HPV DNA, aby bylo možné prohlásit HPV infekci za aktivní (Hoffmann *et al.*, 2010). Výsledky imunohistochemie proteinu p16 mi byly poskytnuty z FN Motol.

5.5.1 Reverzní transkripce

Zpočátku jsem testovala několik různých reverzních transkriptáz, jako jsou SCRIPT Reverse Transcriptase (Jena Bioscience, Německo), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA), LunaScript® RT SuperMix Kit (New England Biolabs, USA) a ProtoScript® II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, USA) všechny podle firemních protokolů. Pro kontrolní PCR byla použita cDNA s primery β -globinu (Saiki *et al.*, 1985) nebo HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) (Olthof *et al.*, 2015) (Tab. 4). Pro všechny analyzované vzorky jsem provedla reverzní transkripci pomocí reverzní transkriptázy ProtoScript® II (New England Biolabs, USA), která v předběžném testování vyšla nejlépe.

Reakce jsem připravovala na ledu. Nejprve jsem namíchala směs o objemu 5 μ l skládající se z 250 ng RNA, 1mM dNTPs (New England Biolabs, USA) a 10 μ M random hexamerů (Thermo Scientific, USA). Roztok jsem denaturovala 5 minut při 65 °C a poté vrátila zpět na led. Následně jsem ke každému vzorku přidala 5 μ l připravené směsi z 2 \times koncentrovaného pufru ProtoScript II (New England Biolabs, USA), 0,02M DTT (New England Biolabs, USA), 100 U ProtoScript® II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, USA), 4 U RNase Inhibitoru (New England Biolabs, USA) a 1,4 μ l vody prosté RNáz. Jako pozitivní kontrolu reverzní transkripce jsem používala RNA izolovanou z buněčné linie SiHa (Kap. 5.8.1), jako negativní kontrolu jsem přidala vodu prostou RNáz namísto templátu RNA. Vzorky jsem inkubovala 5 minut při 25 °C, 1 h při 42 °C a na závěr inaktivovala reverzní transkriptázu 20 min při 65 °C v cykleru GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA).

Reakční směs o objemu 30 μ l pro amplifikační reakci β -globinu (Saiki *et al.*, 1985) se skládala z 1 \times koncentrovaného pufru Taq (Fermentas, USA), 4mM MgCl₂ (Fermentas, USA), 0,2mM směsi nukleotidů, 0,5 μ M primerů PC03/04, 0,75 U Taq Polymerázy (Fermentas, USA), 3 μ l 2 \times ředěné cDNA a 14,6 μ l vody prosté RNáz. Reakce probíhala za podmínek: iniciace denaturace 95 °C po dobu 1 min, 40 cyklů složených z denaturace při 94 °C po dobu 1 min, nasedání primerů při 55 °C po dobu 2 min a prodlužování řetězce při 72 °C po dobu 2 min. Nakonec probíhala fáze extenze 3 min při 72 °C. Elektroforézu pro vyhodnocení PCR jsem provedla na 3% agarózovém gelu, jehož příprava již byla popsána výše (Kap. 5.2.1), za podmínek stejných jako v kapitole 5.4.

Amplifikační reakce HPRT (117 pb) o objemu 25 μ l se skládala z 1 \times koncentrovaného pufru Standard Taq Reaction (New England Biolabs, USA), 0,2 μ M primerů pro HPRT, 0,2mM dNTPs (New England Biolabs, USA), 0,5 U Hot Start Taq DNA polymerázy (New England Biolabs, USA), 19,9 μ l vody prosté RNáz a 1 μ l 2 \times ředěné cDNA. Reakce probíhala za podmínek: iniciace denaturace 95 $^{\circ}$ C po dobu 30 s, následovaná 39 cykly denaturace 30 s při 95 $^{\circ}$ C, nasedání primerů 30 s při 64 $^{\circ}$ C a prodlužování řetězce 30 s při 68 $^{\circ}$ C. Závěrečná extenze probíhala při 68 $^{\circ}$ C po dobu 5 min. Elektroforézu a vyhodnocení PCR jsem provedla stejně jako pro gen β -globin.

5.5.2 Detekce virové mRNA E6 typu HPV16

Aktivní transkripci onkogenů HPV16 jsem stanovovala pomocí detekce virové mRNA E6 za použití specifických primerů pro HPV16 podle Smeets a kol. (Tab. 4), které amplifikují oblast cDNA E6 o délce 86 pb (Smeets *et al.*, 2007). Jedna reakce o objemu 25 μ l se skládala z 1 \times koncentrovaného pufru Taq (Fermentas, USA), 1,5mM MgCl₂ (Fermentas, USA), 0,5 μ M primerů pro gen E6, 0,5 U Taq DNA polymerázy (Fermentas, USA), 0,2mM směsi nukleotidů, 17,4 μ l vody prosté RNáz a 2 μ l 2 \times ředěné cDNA. Jako negativní kontrolu jsem použila vodu prostou RNáz a jako pozitivní kontrolu jsem přidala cDNA z buněčné linie SiHa. Reakce proběhla v cykleru Peltier Thermal Cycler 200 (MJ-Research, Kanada) za podmínek: iniciace denaturace 94 $^{\circ}$ C po dobu 5 min, následováno 39 cykly denaturace 1 min při 94 $^{\circ}$ C, nasedání primerů 2 min při 55 $^{\circ}$ C, prodlužování řetězce 2 min při 72 $^{\circ}$ C. Fáze extenze probíhala při 72 $^{\circ}$ C po dobu 3 min. Produkty PCR byly analyzovány za stejných podmínek jako detekce genu E6 na DNA HPV16 (Kap. 5.4).

5.6 Analýza expresního profilu miRNA metodou sekvenace nové generace

Sekvenování nové generace byla podrobena RNA izolovaná z celkem 30 vybraných FFPE vzorků tkání vulvy, cervixu, anu a tonsil. Příprava sekvenačních knihoven a následně sekvenování nové generace (NGS) probíhaly na dvou různých pracovištích. Vzorky vulvy, cervixu a tonsil byly sekvenovány v Ruđer Bošković Institute (IRB) v Chorvatsku (NextSeq 550, Illumina, USA). Knihovny pro tyto vzorky byly připraveny dle protokolu pro malé RNA (TruSeq Small RNA Library prep kit, Illumina, USA). Anální vzorky a překryv vulvárních vzorků byl sekvenován v European Molecular Biology Laboratory (EMBL) v Německu (HiSeq 2500, Illumina, USA), k přípravě knihoven byl použit kit NEBNext Multiplex Small RNA Library prep set for Illumina (New England BioLabs, USA).

5.7 Analýza dat a statistické zpracování

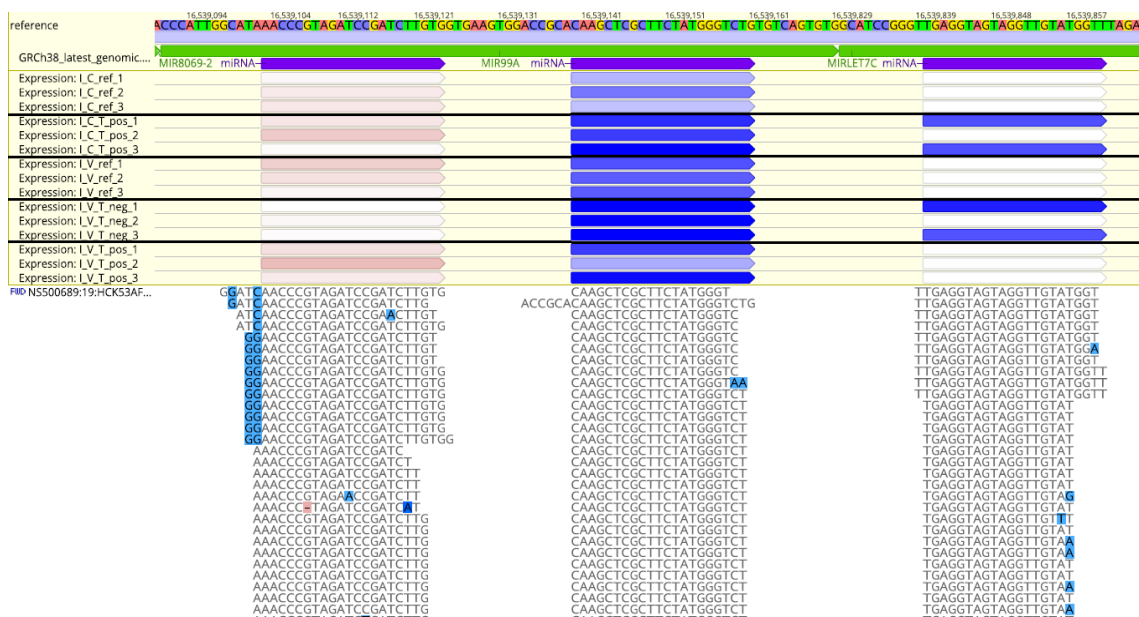
Data ze sekvenování (formát FASTQ) jsem importovala do uživatelského rozhraní BaseSpace (Illumina, USA), zde jsem použila aplikaci FASTQ Toolkit v2.2.0 pro odstranění sekvenačních adaptérů. S daty jsem dále pracovala v programu Geneious v11.1.5 (<https://www.geneious.com>).

Z databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) jsem získala kompletní sekvenci referenčního lidského genomu a příslušnou anotaci, které jsem importovala do programu Geneious. Do programu jsem též importovala sekvenační čtení zbavená adaptérů. Ta jsem poté mapovala na referenční sekvenci (konkatenované sekvence genů 2 654 miRNA přítomných v lidském genomu). Sekvenační čtení byla mapována na referenci podle sekvenační homologie, a minimální přípustnou nukleotidovou identitou rovnou 90 %. Následovala kalkulace relativní exprese jednotlivých miRNA v daném vzorku (Obr. 7). Expresní profily miRNA jednotlivých vzorků byly navzájem porovnány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA), která slouží ke zpracování vícerozměrných dat. Jejich redukcí a zároveň odhalením skrytých proměnných (komponent) ukazuje variabilitu vzorků.

Kalkulace diferenciální exprese miRNA byla provedena s využitím softwaru DESeq2 (Love *et al.*, 2014), který umožňuje určení diferenciální exprese mezi dvěma experimentálními/biologickými podmínkami na souboru replikátů (zde triplikát pro každý typ tkáně). Vždy byla porovnána exprese miRNA mezi nádorovou tkání (tumor pozitivní na HPV nebo negativní na HPV) a zdravou tkání stejné lokalizace, která byla použita jako referenční.

Hodnoty diferenciální exprese jsem exportovala do tabulky a dále zpracovávala. S ohledem na heterogenitu biologických vzorků tohoto typu byl ve statistickém srovnání diferenciální exprese miRNA nastaven limit statistické spolehlivosti *padj* (*p*-value adjusted for multiple testing) jako $\leq 0,1$ a \log_2 hodnoty změny exprese FC (fold change) $> 1,58$. MiRNA, jejichž diferenciální exprese nespĺňovala tato kritéria, nebyly považovány za diferenciálně exprimované a byly z další analýzy vyloučeny.

Překryvy expresních profilů miRNA byly vizualizovány pomocí Vennových diagramů (<http://www.interactivenn.net/>). Heatmapa diferenciální exprese miRNA byla vizualizována na <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>.



Obr. 7 Grafické znázornění relativní exprese miRNA pro jednotlivé typy tkání v programu Geneious. Anotace referenční sekvence: zelené symboly – pri-miRNA, fialové symboly – maturované miRNA vznikající z pri-miRNA. Relativní hladina exprese miRNA u jednotlivých tkání je značena barevným spektrem, kdy červená barva značí vysokou expresi, přechází přes bílou do modré barvy, jež zobrazuje nízkou až nulovou expresi miRNA. Pod expresními profily miRNA jsou vyobrazeny sekvence jednotlivých čtení. I_C_ref – cervikální zdravá tkáň, I_C_T_pos – cervikální nádorová tkáň HPV pozitivní, I_V_ref – vulvární zdravá tkáň, I_V_T_neg – vulvární nádorová tkáň HPV negativní, I_V_T_pos – vulvární nádorová tkáň HPV pozitivní.

5.8 Buněčné linie

5.8.1 Buněčné linie a média

Použité buněčné linie:

- CCL-138 (Detroit 562) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od plicní metastázy lidského faryngeálního karcinomu bez přítomnosti HPV.
- HTB-43 (FaDu) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského faryngeálního karcinomu, bez přítomnosti HPV.
- CRL-3240 (UPCI:SCC152) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského hypofaryngeálního karcinomu, HPV16 pozitivní.
- HTB-35 (SiHa) (používaná v Laboratoři molekulární virologie, Biocev)
Buněčná linie odvozená od lidského karcinomu cervixu, HPV16 pozitivní s integrovanými 1 – 2 kopiemi HPV16 na buňku.
- HaCaT (používaná v Laboratoři molekulární virologie, Biocev)
Immortalizované lidské keratinocyty.

Složení kultivačních médií se lišilo pro jednotlivé buněčné linie (Tab. 5).

Tab. 5 Složení jednotlivých médií použitých k pěstování buněk.

Médium	Komponenty	Výsledná koncentrace	Výrobce
EMEM1 (FaDu, CCL-138)	Minimum Essential Medium Eagle 10×	1×	Sigma-Aldrich, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Penicillin-Streptomycin Solution 100×	1×	Biosera, Francie
	HyClone 100× Vitamin solution	1×	GE Healthcare Life Sciences, USA
	L-Glutamin GlutaMAX™ Supplement	0,4 mM	Gibco, USA
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×)	1×	Thermo Fisher Scientific, USA
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,15 % (w/v)	Gibco, USA
	Sodium Pyruvate	1 mM	Sigma-Aldrich, USA
EMEM2 (CRL-3240)	Minimum Essential Medium Eagle 10×	1×	Sigma-Aldrich, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	L-Glutamin GlutaMAX™ Supplement	0,4 mM	Gibco, USA
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×)	1×	Thermo Fisher Scientific, USA
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,15 % (w/v)	Gibco, USA
	Gentamicin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich, USA
RPMI1 (SiHa)	RPMI 1640 Medium		Gibco, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Penicillin-Streptomycin Solution 100×	1×	Biosera, Francie
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,20 % (w/v)	Gibco, USA
RPMI2 (HaCaT)	RPMI 1640 Medium		Gibco, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Penicillin-Streptomycin Solution 100×	1×	Biosera, Francie
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,20 % (w/v)	Gibco, USA

5.8.2 Práce s buněčnými kulturami

Buněčné linie CRL-3240, CCL-138 a FaDu jsem pro počáteční ověření exprese miRNA obdržela již kultivované, připravené k izolaci a zamrazení od RNDr. Viery Ludvíkové z Oddělení imunologie na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Buněčné linie CRL-3240 a FaDu jsem dále kultivovala sama pro účely transfekce. Stejně tak jsem si připravila linii SiHa a HaCaT k izolaci RNA. Všechny použité buněčné linie jsou adherentní a každá vyžaduje specifické médium (Tab. 5). Práce probíhala v laminárním boxu BioVanguard (Telstar, Španělsko).

Buněčné linie SiHa a HaCaT nevyžadovaly modifikaci média po rozmrazení. U buněk CRL-3240 jsem bezprostředně po rozmrazení buněk používala EMEM2 médium připravené pro tuto buněčnou linii (Tab. 5) s 20% fetální bovinním sérem (FBS) a bez gentamicinu, který jsem přidávala až po druhé pasáži. Stejně tak jsem pro rozmrazení linie FaDu buňky kultivovala v kompletním EMEM1 médiu (Tab. 5) s 20% FBS. Počet rozmrazovaných buněk byl: FaDu 5×10^6 , CRL-3240 4×10^6 , HaCaT 1×10^6 a SiHa 1×10^6 .

Rozmrazení probíhalo ponořením zkumavky s buňkami do vody o 37 °C, následně byly buňky přeneseny do 15 ml zkumavky s 9 ml média a centrifugovány v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo) 10 min na 350×g při 4 °C. Zkumavky jsem poté vyndala, odstranila supernatant a pelet resuspendovala v 7 ml temperovaného média. Vše jsem pipetou přenesla na 25cm² kultivační lahev. Inkubace buněčných kultur probíhala v CO₂ inkubátoru MCO 170AIC (Panasonic, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

Pasáž buněk FaDu byla provedena po 24 h, další pasáže následovaly za 48 h. Buněčné linie CRL-3240, SiHa a HaCaT byly vždy pasážovány po 48 h.

Nejprve jsem z kultivační lahve odstranila všechno médium a provedla oplach buněk 3 ml 1× koncentrovaným Trypsin/EDTA (Biosera, Francie) pro lahev o velikosti 25 cm². Znovu jsem přidala 1 ml Trypsin/EDTA. Lahev jsem inkubovala v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ 3 min u buněčné linie SiHa a HaCaT, 15 min FaDu a 30 min CRL-3240. Buňky jsem kontrolovala pod inverzním mikroskopem NIB100F (Novel, Čína), zda se oddělily ode dna lahve. Poté jsem inaktivovala Trypsin/EDTA 4 ml temperovaného kompletního média. U buněk CRL-3240 a FaDu jsem přenesla celý objem na 75 cm² kultivační lahev a doplnila to 15 ml temperovaným

kompletním médiem. Linií SiHa a HaCaT jsem pasážovala na 75 cm² kultivační lahev v poměru 1:5. K pasážování buněk na 75 cm² kultivační lahvi jsem použila 6 ml Trypsin/EDTA na oplach a následně 3 ml na oddělení buněk ode dna lahve, médium jsem vždy doplnila na 15 ml. Pro izolaci RNA jsem použila buňky po třetí pasáži a vždy jsem buňky před izolací počítala v Bürkerově komůrce.

5.9 Izolace RNA z buněčných linií

Izolaci RNA z buněčných linií jsem provedla pomocí mirVanaTM miRNA Isolation Kitu s fenolem (Ambion, USA) dle firemního protokolu. K izolaci buněk pro ověření exprese miRNA v buněčných liniích po analýze sekvenace nové generace jsem použila 2 – 3 miliony buněk. Pro izolaci buněčné RNA z buněk transfekovaných mimikující či inhibitorovou miRNA či jejich netransfekovaných kontrol jsem měla k dispozici 5×10⁵ buněk a tuto RNA jsem následně použila k ověření exprese transfekovaných miRNA. Vždy jsem ke vzorkům přidala negativní kontrolu izolace.

Buňky jsem inkubovala v roztoku trypsin/EDTA, poté, co se oddělily ode dna kultivační láhve jsem inaktivovala trypsin/EDTA kompletním médiem. Vše jsem pipetovala do 15ml zkumavek a centrifugovala v Universal 320R (Hettich, Německo) 10 min na 350×g při 4 °C. Po odstranění média jsem pelet resuspendovala v 1 ml 1× fosfátového pufru (PBS, phosphate buffered saline) (Biosera, Francie) a znovu centrifugovala 10 min na 350×g při 4 °C. Po šetrném odstranění PBS jsem pelet resuspendovala ve 400 µl Lysis/Binding pufru až do úplné lýze buněk. Dále jsem přidala 40 µl roztoku miRNA Homogenate Additive, vše jsem řádně promíchala a nechala inkubovat 10 min na ledu. Poté jsem přidala 400 µl směsi kyselého fenol-chloroformu, důkladně promíchala a centrifugovala v odstředivce Eppendorf 5424 (Eppendorf, Německo) 5 min při 10 000×g. Do čisté zkumavky jsem pipetou přenesla horní vodnou fázi, ke které jsem přidala 563 µl 100% etanolu. Směs jsem po 700 µl nanasla na filtrační kolonky, připravené v 1,5ml zkumavkách a centrifugovala 30 s při 10 000×g, přefiltrovanou tekutinu jsem slila a postup opakovala, dokud se nepřefiltroval všechn vzorek. Následovaly promývací kroky, kdy jsem na kolonku postupně pipetovala 700 µl roztoku promývacího miRNA 1 (miRNA Wash Solution 1), centrifugovala 30 s při 10 000×g a dvakrát 500 µl roztoku promývacího miRNA 2/3 (miRNA Wash Solution

2/3) a znovu centrifugovala 30 s při 10 000×g. Pro celkové odstranění promývacího roztoku z filtru jsem provedla centrifugaci 1 min při 10 000×g. Kolonku jsem přenesla do čisté 1,5 ml zkumavky a na střed filtru jsem pipetovala 50 µl elučního roztoku vytemperovaného na 95 °C. Závěrečná centrifugace probíhala na 20 000×g po dobu 30 s. Tento krok jsem znovu opakovala s dalšími 50 µl elučního roztoku. Koncentraci RNA jsem měřila na NanoDropu 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky RNA jsem uchovávala v mrazničce na -80 °C.

5.10 Ověření exprese miRNA v buněčných liniích

K ověření exprese vybraných miRNA ve všech buněčných liniích jsem použila metodu RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR) s využitím specifických TaqMan MicroRNA sond dodávaných spolu s příslušnými primery (Thermo Fisher Scientific, USA) (Tab. 6) a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kitu (Thermo Fisher Scientific, USA).

Příprava směsi pro reverzní transkripci probíhala na ledu. Samotná reakce měla objem 15 µl. Nejprve jsem si připravila 7 µl směsi skládající se z 1× koncentrovaného pufru RT, 1mM dNTPs, 50 U MultiScribe™ reverzní transkriptázy a 3,8 U RNase inhibitoru. Následně jsem přidala 3 µl 5× koncentrovaného příslušného primeru a poté jsem pipetovala 10 ng RNA v 5 µl vody prosté RNáz. Vždy jsem použila negativní kontrolu, u které jsem ke směsi s primerem pro referenční RNA RNU48 (small nucleolar RNA, C/D box 48), přidala vodu prostou RNáz namísto templátové RNA, taktéž jsem použila pozitivní kontrolu, kde jsem ke směsi s RNU48 primerem přidala RNA buněčné linie SiHa. Připravenou směs jsem 5 min inkubovala na ledu a následně vložila do cyklieru GeneAmp PCR Systém 9700 (Applied Biosystem, USA) za podmínek: 16 °C po dobu 30 min, 42 °C po dobu 30 min a 85 °C po dobu 5 min.

Reakce pro qPCR (quantitative PCR) jsem pipetovala na ledu či v chladicím stojánku ve zhasnutých laminárních boxech. Pro přípravu standardní křivky o pěti bodech jsem si nejprve přichystala ředící řadu cDNA, kterou jsem získala reverzní transkripcí RNA izolované z buněčných linií SiHa a CRL-3240. Použila jsem neředěnou cDNA, dále pak 3×, 9×, 27× a 81× ředěnou cDNA v triplikátech. Standardní křivku jsem zhotovila pro všechny sondy v tabulce č. 3. Analýzu diferenciální exprese jsem provedla

na 3× ředěné cDNA. Reakce o celkovém objemu 10 µl se skládala z 1× koncentrovaného TaqMan Universal PCR MasterMixu, no AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, USA), 1× koncentrované TaqMan sondy, 2 µl cDNA o příslušném ředění a 2,5 µl vody prosté RNáz. Každý vzorek byl připraven a pipetován do 0,1ml zkumavek v triplicátu. Vždy jsem k reakci přidala negativní kontrolu, u které jsem ke směsi se sondou pro referenční RNA RNU48 přidala namísto templátové RNA vodu prostou RNáz. Amplifikační reakce probíhala v cyklu RotorGene 3000 (Qiagen, Německo) za podmínek: inkubace 2 min při 50 °C, aktivace polymerázy 10 min při 95 °C, 40 cyklů skládajících se z 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 60 s.

Tab. 6 Přehled použitých TaqMan MicroRNA sond pro kontrolní buněčné linie.

TaqMan MicroRNA sonda	Sekvence maturované miRNA
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-21*	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
hsa-miR-20b	ACUGUAGUAUGGGCACUCCAG
TaqMan MicroRNA kontrolní sonda	Kontrolní sekvence
RNU48	GATGACCCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTCGCTGATGCCATCA CCGCAGCGCTCTGACC

Amplifikační křivky byly hodnoceny software Corbett Rotor-Gene 6000 v.1.7 (Qiagen, Německo). K výsledným křivkám jsem importovala hodnotu prahu detekce fluorescence (threshold), kterou jsem pro danou sondu stanovila pomocí standardních křivek, a získala Ct hodnoty vzorků. Analýzu relativní kvantifikace jsem prováděla pomocí softwaru GenEx v.6 (MultiD Analyses AB, Švédsko). Pro normalizaci dat jsem použila referenční krátkou nukleární RNA RNU48, kterou již dříve použila k analýze diferenciální exprese miRNA Zuzana Vojtěchová, Ph.D. a byla vybrána na základě literatury jako krátká RNA se stabilní expresí. Vždy jsem provedla korekci účinnosti amplifikace.

Pro všechny vzorky jsem stanovila:

$$\Delta Ct_{\text{vzorek}} = Ct_{\text{studovaná miRNA}} - Ct_{\text{referenční miRNA (RNU48)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibrátor (HaCaT)}} = Ct_{\text{studovaná miRNA}} - Ct_{\text{referenční miRNA (RNU48)}}$$

Poté jsem určila:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{studovaná miRNA}} - \Delta Ct_{\text{kalibrátor (HaCaT)}}$$

pro relativní kvantifikaci sledované miRNA mezi kontrolním vzorkem a testovaným vzorkem a vyjádřila jako $2^{-\Delta\Delta Ct}$

5.11 Transfekce mimikující/inhibující miRNA do buněčných linií

Pro transfekci vybraných mimikujících a inhibujících miRNA jsem použila buněčné linie CRL-3240 a FaDu. Buněčnou linii FaDu, která je negativní na HPV, jsem transfekovala mimikující miR-9-5p, protože exprese této miRNA na základě mého ověření exprese miRNA v buněčné linii, není zvýšena (FC nižší než 1,58) (Kap. 6.6). Na základě svých výsledků ze sekvenování nové generace (Kap. 6.5), jsem vybrala a transfekovala mimikující miR-139-5p (Invitrogen, USA) do buněčné linie CRL-3240 pozitivní na HPV. MiR-139-5p vyšla jako miRNA, která má sníženou diferenciální expresi v nádorech pozitivních na HPV (FC nižší než 1,58). Buněčnou linii CRL-3240 jsem také chtěla transfekovat inhibující miR-9-5p (Invitrogen, USA), důvodem je zvýšená exprese miR-9-5p v nádorech pozitivních na HPV (FC vyšší než 1,58), což jsem také potvrdila ověřením diferenciální exprese miRNA v buněčných liniích (Kap. 6.6) a na základě literatury (Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). Inhibující miR-9-5p jsem nakonec k transfekci nepoužila, z důvodů neúspěšné optimalizace pozitivní kontroly inhibitoru.

Jako pozitivní kontrolu transfekce mimikující miRNA jsem použila miR-1 (Invitrogen, USA), která se běžně vyskytuje jen v lidských svalových buňkách. Inhibující let-7c miRNA (Invitrogen, USA) sloužila jako pozitivní kontrola při transfekci inhibující miRNA miR-9. Vždy jsem použila též negativní kontroly, a to mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1 (Invitrogen, USA) pro mimikující miRNA a mirVana™ miRNA Inhibitor, Negative Control #1 (Invitrogen, USA) pro inhibující miRNA.

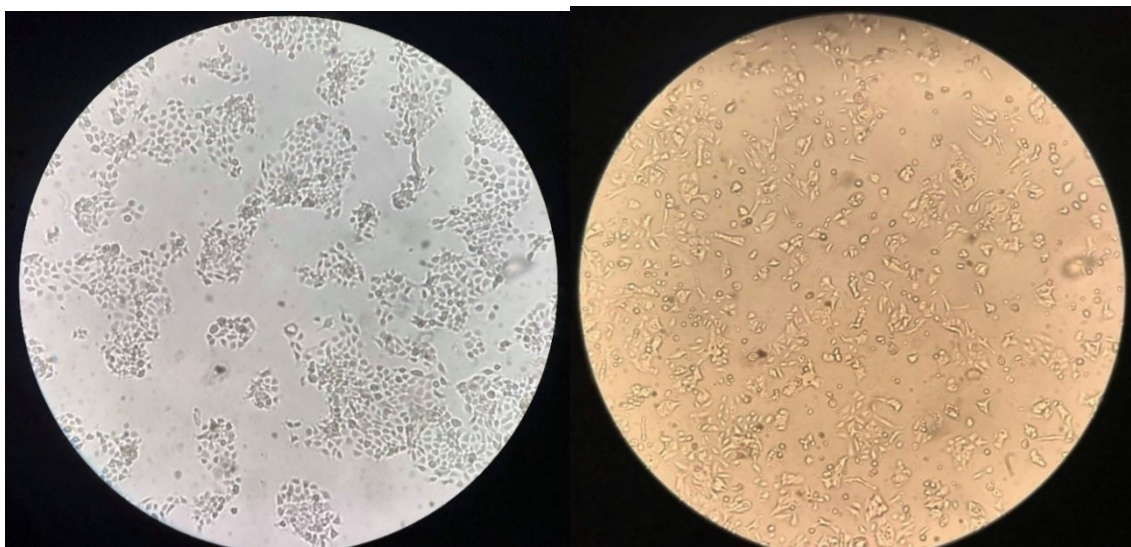
Všechny transfekční pokusy byly porovnány s netransfekovanými buňkami a byly provedeny v biologických duplikátech.

Před samotnou transfekcí jsem optimalizovala použité množství mimikujících/inhibujících miRNA pro transfekce za využití čtyř ředění (5 pmol, 15 pmol, 30 pmol a 60 pmol) pozitivních kontrol miR-1 a let-7c. U inhibitoru let-7c se tato množství neprojevila na inhibici buněčné miRNA, proto jsem aplikovala vyšší látkové množství inhibitoru, a to 80 pmol, 100 pmol, 120 pmol a 150 pmol. Poté jsem používala 5 pmol mimikující miR-9 pro buněčnou linii FaDu a 15 pmol mimikující miR-139 pro buněčnou linii CRL-3240, množství inhibující miRNA se mi nepodařilo optimalizovat.

Buněčné linie jsem kultivovala dle postupu popsaného v předchozí podkapitole 5.8.2. Po třetí pasáži jsem buňky v duplikátech nasadila na 6-jamkovou destičku ve 2 ml kompletního média. Nasazovala jsem 15×10^4 buněk CRL-3240 a 10×10^4 buněk FaDu. Po 24 h jsem odebrala kompletní médium a přidala médium bez antibiotik. 48h po nasazení dosahovala konfluencí buněk požadovaných 30 % – 50 % nutných k transfekci (Obr. 8).

Ve zkumavce jsem v 250 μ l Opti-MEM média rozpustila 5 μ l transfekčního činidla Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) pro jednu jamku destičky a směs inkubovala 5 min při pokojové teplotě. Poté jsem rozpustila 5 pmol (FaDu) či 15 pmol (CRL-3240) mimikující miRNA v 250 μ l Opti-MEM média, pipetovala k 250 μ l směsi s Lipofectaminem 2000 a vše inkubovala 20 min při pokojové teplotě. Během této doby jsem v 6-jamkových destičkách vyměnila médium za čerstvé médium bez antibiotik a přidala 500 μ l směsi Lipofectaminu s miRNA ke konkrétním buňkám. Po 6 h inkubaci v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ jsem opět vyměnila médium za čerstvé médium bez antibiotik. Inkubace dále pokračovala v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂ po dalších 42 h.

Po uplynutí 2 dnů od transfekce jsem izolovala RNA podle postupu popsaném v podkapitole 2.9.



Obr. 8 Buněčné linie v den transfekce miRNA. Vlevo – FaDu, vpravo – CRL-3240. Zvětšení 100×, inverzní mikroskop NIB100F.

5.12 Ověření transfekce mimikujícími/inhibujícími miRNA

U transfekovaných buněčných liniích jsem detekovala miRNA pomocí RT-qPCR stejně jako u netransfekovaných buněk (Kap. 5.10), použití některých TaqMan MicroRNA sond se však lišilo (Tab. 7). Sondy spolu s primery byly vybrány tak, aby odpovídaly transfekovaným miRNA. Postup reverzní transkripce a kvantitativní PCR je popsán v kapitole 5.10.

Jako endogenní kontrolu pro normalizaci jsem znovu použila referenční RNA RNU48 a data analyzovala stejným postupem popsáním v kapitole 5.10. Pouze jsem použila jiný kalibrátor, a to netransfekované buňky (NB).

$$\Delta C_{t_{\text{kalibrátor (NB)}}} = C_{t_{\text{studovaná miRNA}}} - C_{t_{\text{referenční miRNA (RNU48)}}$$

Tab. 7 Přehled použitých TaqMan MicroRNA sond pro transfekované buňky.

TaqMan MicroRNA Assay	Sekvence maturované miRNA
hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
TaqMan MicroRNA kontrolní sonda	Kontrolní sekvence
RNU48	GATGACCCCAGGTA ACTCTGAGTGTGTCGCTG ATGCCATCACCGCAGCGCTCTGACC

6 Výsledky

6.1 Izolace nukleových kyselin

Má práce navazuje na výzkum Zuzany Vojtěchové, Ph.D., která k izolaci nukleových kyselin z FFPE vzorků použila RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, USA). Protože jsem chtěla zachovat shodný postup z předešlé studie, použila jsem stejný kit pro izolaci ze vzorků V1N, V2N, V4T, V8N, C17T, C17N, C19N a CT1 (Tab.8). Izolovaná RNA však nedosahovala požadované koncentrace pro sekvenování nové generace. Tato požadovaná koncentrace se lišila dle místa sekvenace, z důvodů použití různých kitů pro přípravu knihovny. Požadovaná koncentrace servisním pracovištěm v Chorvatsku byla 200 ng/μl a v Německu 67 ng/μl. Abych zjistila, zda je rozdíl v izolovaném typu tkáně, použila jsem k izolaci dva vzorky tonsil TT1 a TT2. V předchozí studii dosahovaly koncentrace izolované RNA z FFPE tonsil rozmezí 27 ng/μl až 475 ng/μl. Koncentrace RNA ve vzorcích TT1 a TT2 byla pouze 13 ng/μl a 14 ng/μl. Zkusila jsem změnit metodu a využít jiné kity určené k současné izolaci RNA a DNA AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, USA) a *TRIzol*™ Reagent (Invitrogen, USA) pro izolaci RNA na tkáni cervixu (CT1-4) (Tab. 8). Nicméně hodnoty poměru absorbancí izolované RNA při vlnových délkách 260/280, až na jeden vzorek (CT3), nedosahovaly hodnot stanovených pro nukleové kyseliny, které je v rozmezí 1,8 – 2,0.

Na základě předchozích výsledků jsem k izolaci používala kit AllPrep® DNA/RNA FFPE (Qiagen, USA) s modifikovaným protokolem, se kterým koncentrace RNA a DNA u části vzorků dosahovala potřebného množství k sekvenování (Tab. 9 – 11).

Izolaci AllPrep® DNA/RNA FFPE kitem jsem provedla celkem na 70 FFPE vzorcích. Vzorky byly značeny: TT – nádorová tkáň tonsily, CT – cervix nádorová tkáň, CN – cervix zdravá tkáň, VT – vulva nádorová tkáň, VN – vulva zdravá tkáň, AC – anus nádorová tkáň, ACN – anus zdravá tkáň. Vzorků z oblasti vulvy bylo celkem 31, z nichž bylo 7 vzorků zdravá tkáň a 24 vzorků nádorová tkáň (Tab. 9). U vzorků V6T a V8T jsem vzhledem k nízké koncentraci RNA již nepokračovala v izolaci DNA. Z cervikální oblasti bylo 18 vzorků, z nichž bylo 6 vzorků zdravé tkáně a 12 nádorové tkáně. U vzorku

C3T se nepodařilo izolovat RNA (Tab. 10). Z anální oblasti jsem měla k dispozici celkem 21 vzorků, z toho 2 vzorky zdravé tkáně a 19 vzorků análních karcinomů (Tab. 11).

Tab. 8 Porovnání metod izolace DNA/RNA vzorků. R – RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit, Q – AllPrep® DNA/RNA/miRNA Universal Kit, T - *TRIzol*™ Reagent, x – neizolováno.

Označení vzorku	Materiál	Metoda izolace	RNA		DNA	
			Nanodrop (ng/μl)	A260/280	Nanodrop (ng/μl)	A260/280
V1N	vulva	R	3,20	2,59	12,80	2,04
V2N	vulva	R	3,40	4,35	5,30	2,64
V4T	vulva	R	57,00	2,03	6,00	2,51
V8N	vulva	R	4,00	2,18	10,00	2,19
C17T	cervix	R	4,90	2,04	12,90	1,94
C17N	cervix	R	4,20	2,36	1,90	5,98
C19N	cervix	R	2,50	6,00	6,90	2,47
TT1	tonsila	R	13,30	1,92	93,00	2,49
TT2	tonsila	R	14,20	1,95	94,90	2,34
CT1	cervix	R	2,50	2,51	x	x
CT2	cervix	T	67,40	1,59	x	x
CT3	cervix	Q	28,10	1,82	x	x
CT4	cervix	T	40,20	1,62	x	x

Tab. 9 Přehledová tabulka izolovaných vzorků vulvární oblasti s naměřenou koncentrací a absorbcí RNA a DNA.

Označení vzorku	Typ tkáňe	RNA		DNA	
		Nanodrop (ng/μl)	A260/280	Nanodrop (ng/μl)	A260/280
V1T	nádorová	19,90	2,07	68,20	2,04
V2T	nádorová	158,90	1,84	126,90	1,90
V3T	nádorová	262,00	1,94	160,70	1,82
V5T	nádorová	65,80	1,98	22,30	1,74
V6T	nádorová	20,70	1,95	x	x
V7T	nádorová	62,40	1,85	50,30	1,82
V8T	nádorová	14,10	2,26	x	x
V10T	nádorová	21,80	1,89	37,50	1,82
V10N	zdravá	26,40	1,99	25,60	2,21
V12T	nádorová	144,10	1,91	184,70	1,85
V12N	zdravá	5,30	2,78	5,20	4,67
V13T	nádorová	35,30	2,00	48,80	1,86
V13N	zdravá	8,60	2,10	10,20	1,69
V14T	nádorová	43,10	1,99	37,90	1,85
V14N	zdravá	8,10	2,84	7,60	4,98
V15T	nádorová	224,90	1,91	243,20	1,82
V11	nádorová	160,10	1,86	71,30	1,76
V16T	nádorová	513,50	1,86	181,80	1,85
V17T	nádorová	426,90	1,90	350,40	1,87
V18T	nádorová	362,70	1,94	362,40	1,84
V19N	zdravá	113,70	1,85	316,30	1,88
V20N	zdravá	505,80	1,89	224,00	1,86
V21N	zdravá	210,90	1,89	206,00	1,85
V22	nádorová	63,90	1,91	5034,60	2,04
V23	nádorová	306,00	1,94	1222,60	1,93
V24	nádorová	326,70	2,02	1856,30	2,05
V25	nádorová	134,50	1,86	2649,70	2,03
V26	nádorová	213,20	1,91	1240,70	2,01
V27	nádorová	64,70	1,54	542,00	1,99
V28	nádorová	108,60	1,68	174,50	1,96
V29	nádorová	161,20	1,99	43,30	1,94

Tab. 10 Přehledová tabulka izolovaných vzorků cervikální oblasti s naměřenou koncentrací a absorbcí RNA a DNA. x – neizolováno.

Označení vzorku	Typ tkáně	RNA		DNA	
		Nanodrop (ng/μl)	A260/280	Nanodrop (ng/μl)	A260/280
C1T	nádorová	33,10	2,00	95,60	1,85
C2T	nádorová	179,50	1,97	196,20	1,90
C2N	zdravá	31,70	2,00	67,50	1,92
C3T	nádorová	x	x	69,30	1,92
C5T	nádorová	57,00	1,93	113,00	1,81
C6T	nádorová	61,60	1,92	129,50	1,82
C9N	zdravá	7,60	2,24	17,30	1,99
C12T	nádorová	39,40	1,68	248,50	1,89
C12N	zdravá	31,30	1,98	53,00	1,89
C15T	nádorová	30,80	1,90	139,00	1,83
C18T	nádorová	20,30	1,97	58,40	1,90
C19T	nádorová	511,30	1,92	42,50	1,93
C20	nádorová	68,20	1,91	356,40	1,86
C4T	nádorová	232,50	1,92	656,00	1,83
C13T	nádorová	263,20	1,90	184,00	1,82
C21N	zdravá	553,10	1,93	957,90	1,86
C22N	zdravá	394,50	1,87	562,80	1,86
C23N	zdravá	366,50	1,91	324,10	1,87

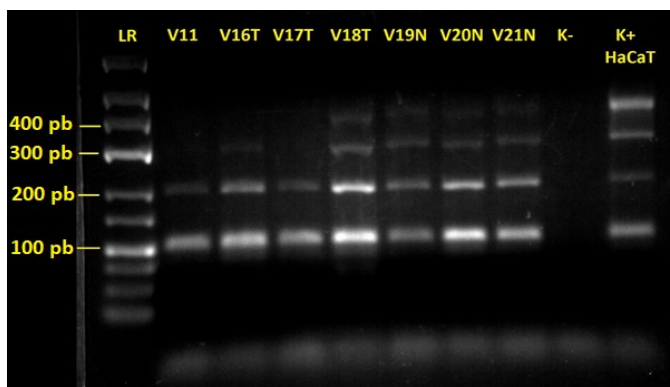
Tab. 11 Přehledová tabulka izolovaných vzorků anální oblasti s naměřenou koncentrací a absorbcí RNA a DNA.

Označení vzorku	Typ tkáně	RNA		DNA	
		Nanodrop (ng/μl)	A260/280	Nanodrop (ng/μl)	A260/280
AC12	nádorová	117,70	1,75	622,00	1,97
AC26	nádorová	29,30	1,53	102,30	1,92
AC34	nádorová	134,60	1,97	20,30	1,88
AC35	nádorová	65,90	1,43	152,30	1,94
AC36	nádorová	45,10	1,96	419,50	1,99
AC37	nádorová	56,50	1,47	37,20	1,89
AC38	nádorová	1826,40	2,01	1327,30	1,96
AC39	nádorová	416,30	1,97	705,60	1,94
AC40	nádorová	158,60	1,96	639,40	1,95
AC41	nádorová	58,50	2,03	283,00	1,94
AC42	nádorová	29,90	1,98	342,70	2,01
AC43	nádorová	574,20	2,01	582,00	1,99
AC44	nádorová	192,10	1,97	150,00	1,78
AC45	nádorová	31,80	1,60	121,10	1,95
AC46	nádorová	166,90	1,94	2807,40	2,01
AC47	nádorová	136,70	1,88	442,30	2,01
AC48	nádorová	268,20	1,96	2514,30	2,01
AC49	nádorová	238,20	2,01	263,20	1,93
AC50	nádorová	54,30	1,96	241,50	1,96
ACN1	zdravá	117,60	1,91	678,40	2,02
ACN2	zdravá	317,20	1,91	113,00	1,96

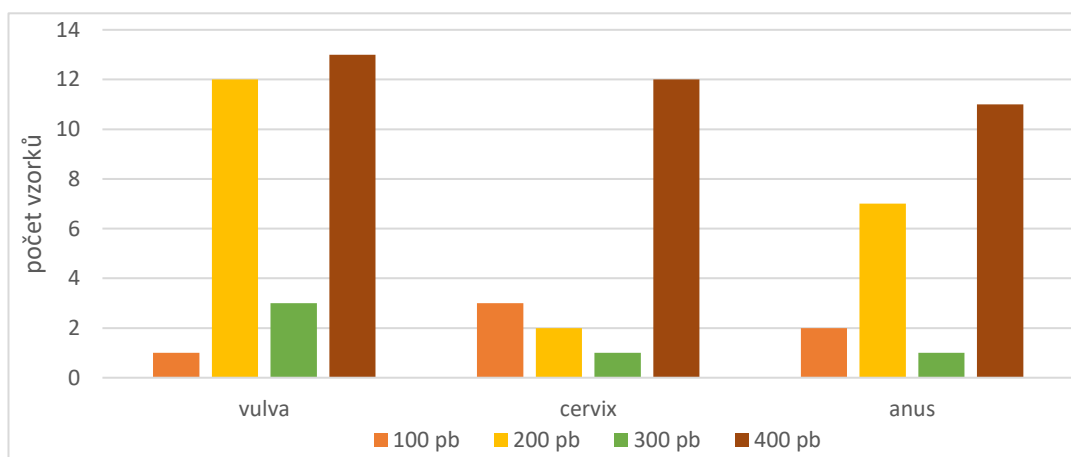
6.1.1 Určení délek fragmentů DNA

K určení délky fragmentů DNA jsem použila směs primerů pro referenční gen GAPDH, jenž jsou navrženy tak, aby jejich amplikony dosahovaly délek 100 pb, 200 pb, 300 pb a 400 pb (Beers *et al.*, 2006) (Obr. 9).

Detekci fragmentů DNA jsem provedla na všech izolovaných vzorcích (Tab. 12). Maximální délky fragmentu 100 pb dosahovalo 6 (9 %) vzorků, 200 pb 21 (31 %) vzorků, 300 pb 5 (7 %) vzorků a 400 pb 36 (53 %) vzorků vulvy, cervixu a anu (Obr. 10). Tyto informace mi sloužily jako ukazatel míry fragmentace DNA a pro srovnání s následnou detekcí genu E6 na DNA pomocí PCR, kde očekávaná délka amplikonů je 248 pb.



Obr. 9 Produkty amplifikace genu GAPDH. LR – GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), K- – negativní kontrola, K+ – pozitivní kontrola HaCaT.



Obr. 10 Srovnání počtu vzorků podle maximální detekované délky amplikonů genu GAPDH v tkáních vulvy, cervixu a anu.

Tab. 12 Přehled velikostí fragmentů DNA u jednotlivých vzorků. Vzorky označené + jsou pozitivní, - negativní, +- slabě pozitivní.

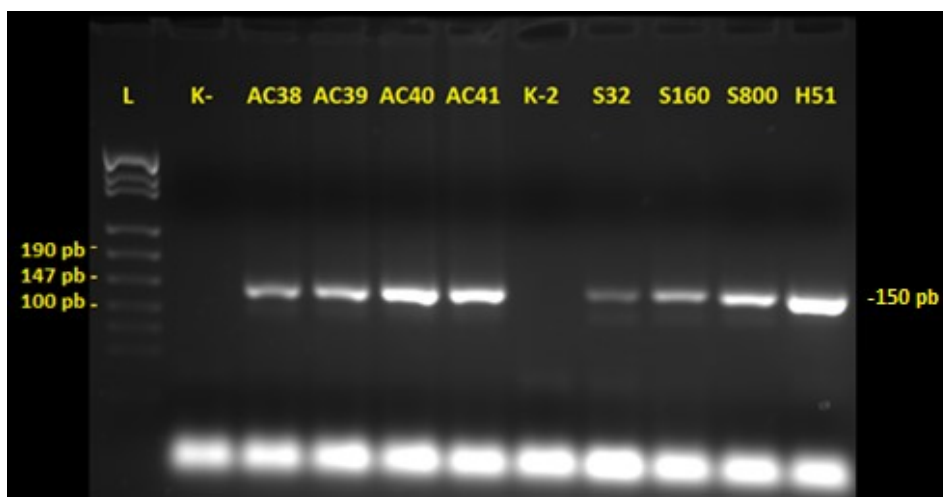
Označení vzorku	GAPDH 100 pb	GAPDH 200 pb	GAPDH 300 pb	GAPDH 400 pb
V1T	+	+	+-	+-
V2T	+	+	-	-
V3T	+	+	-	-
V5T	+	+	+-	+-
V7T	+	-	-	-
V10T	+	+	-	-
V10N	+	+	-	-
V12T	+	+	-	-
V12N	+	+	+	+
V13T	+	+	-	-
V13N	+	+	+-	+-
V14T	+	+	+	+
V14N	+	+	+	+
V15T	+	+	-	-
V11	+	+	-	-
V16T	+	+	+	-
V17T	+	+	-	-
V18T	+	+	+	+
V19N	+	+	+	+
V20N	+	+	+	+
V21N	+	+	+	+
V22	+	+	-	-
V23	+	+	+	+
V24	+	+	+-	+
V25	+	+	-	-
V26	+	+-	-	-
V27	+	+	+	-
V28	+	+	+	+
V29	+	+	+	-

Označení vzorku	GAPDH 100 pb	GAPDH 200 pb	GAPDH 300 pb	GAPDH 400 pb
C1T	+	+	-	-
C2T	+	-	-	-
C2N	+	+	+	-
C3T	+	-	-	-
C5T	+	+	+	+
C6T	+	+	-	-
C9N	+	+	+	+
C12T	+	+	+	+
C12N	+	+	+	+
C15T	+	+	+	+-
C18T	+	+	+	+
C19T	+	+	+	+
C20	+	+	+	+
C4T	+	+	+	+
C13T	+	-	-	-
C21N	+	+	+	+-
C22N	+	+	+	+
C23N	+	+	+	+
AC12	+	+	-	-
AC26	+	+	-	-
AC34	+	+	-	-
AC35	+	+	-	-
AC36	+	+	-	-
AC37	+	+	-	-
AC38	+	+	+	+
AC39	+	+	+	+
AC40	+	+	+	+
AC41	+	+	+	+
AC42	+	+	+	+
AC43	+	+	+	+-
AC44	+	+	+	+
AC45	+	-	-	-
AC46	+	+	+-	-
AC47	+	+	+	+-
AC48	+	+-	-	-
AC49	+	+	+	+
AC50	+	+	+	+
ACN1	+	+	-	-
ACN2	+	+	+	+

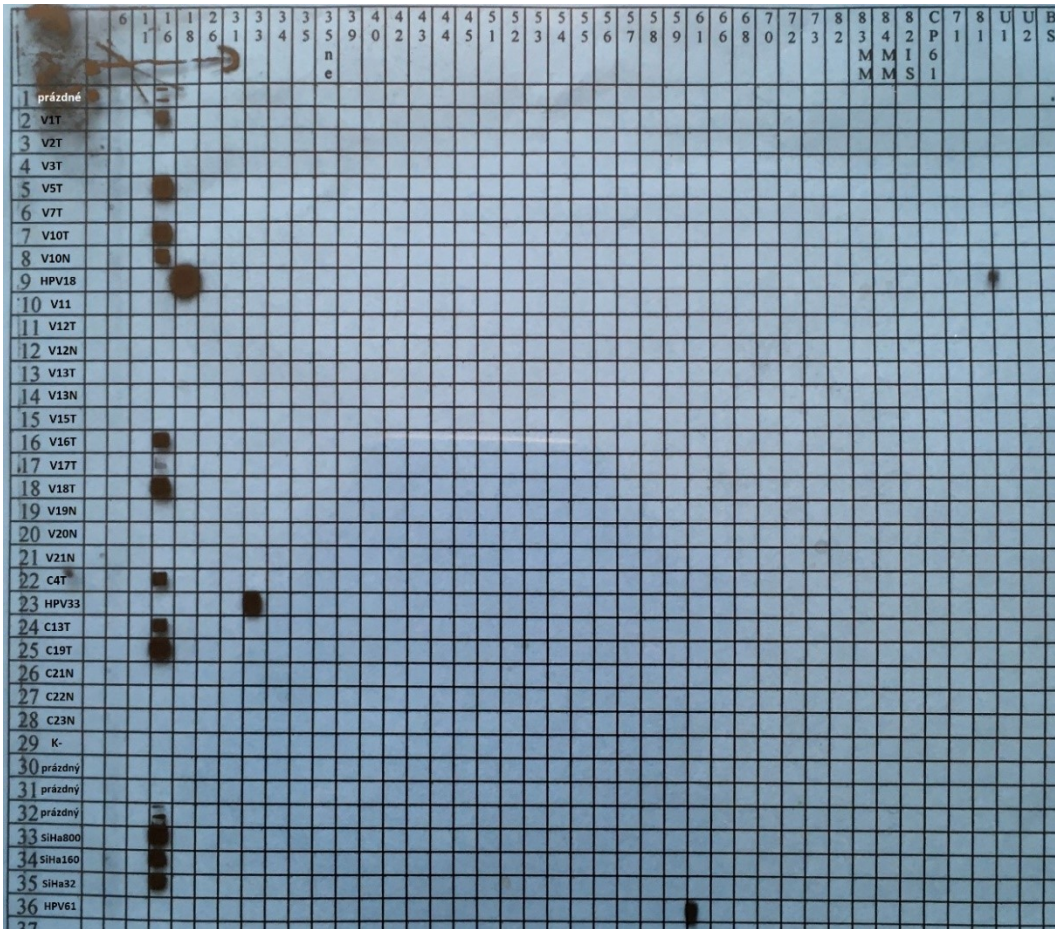
6.2 Určení genotypu papilomaviru

Na všech vzorcích jsem provedla PCR amplifikující 150 pb dlouhou oblast genu (Obr. 11). Produkty PCR jsem nanesla na kontrolní elektroforézu, a dále je využila pro určení přítomného genotypu HPV metodou RLB (Tab. 13) (Kap. 5.3). Tato metoda umožňuje identifikovat 37 typů HPV a průkaz infekcí více typy HPV (Obr. 12).

Z celkového počtu 68 testovaných vzorků bylo 38 (56 %) vzorků pozitivní na HPV, z nichž 35 (92 %) bylo pozitivních na HPV16. Všechny vzorky s nádorovou tkání cervixu byly pozitivní na HPV, z toho 10 (83 %) vzorků bylo pozitivních na HPV16. Dva vzorky byly pozitivní na HPV45 (C12T, C12N), oba byly získány od jednoho pacienta, u kterého se virus mohl rozšířit i do okolní zdravé tkáně. Dále jsem identifikovala vzorek C1T jako pozitivní na HPV39. Z 19 vzorků nádorové tkáně anální oblasti bylo 16 (84 %) vzorků pozitivních na HPV16, jeden vzorek (AC43) byl pozitivní na 3 typy papilomavirů 16, 18 a 44 a zbylé 3 vzorky byly negativní na HPV. Z 22 vzorků vulvárních karcinomů bylo pouze 9 (41 %) vzorků pozitivních na HPV16, zbylé vzorky nádorové tkáně byly negativní na HPV.



Obr. 11 Vizualizace PCR s primery amplifikujícími gen L1 (150 pb). Amplikony délky 150 pb jsou posunuty, kvůli odlišné koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku a žebříčku a její vazbě na GelRed™ (Biotium, USA), který tak mění jejich mobilitu. Správnost amplikonů již byla v naší laboratoři prověřena. L – žebříček pUC19 DNA/MspI; K- – negativní kontrola izolace; K-2 – negativní kontrola PCR; S32, S160, S800 – SiHa (počet kopií HPV16/reakci); H51 – HPV51.



Obr. 12 Lumifilm exponovaný 5 min. Vertikální osa – nanesené vzorky, horizontální osa – typ HPV.

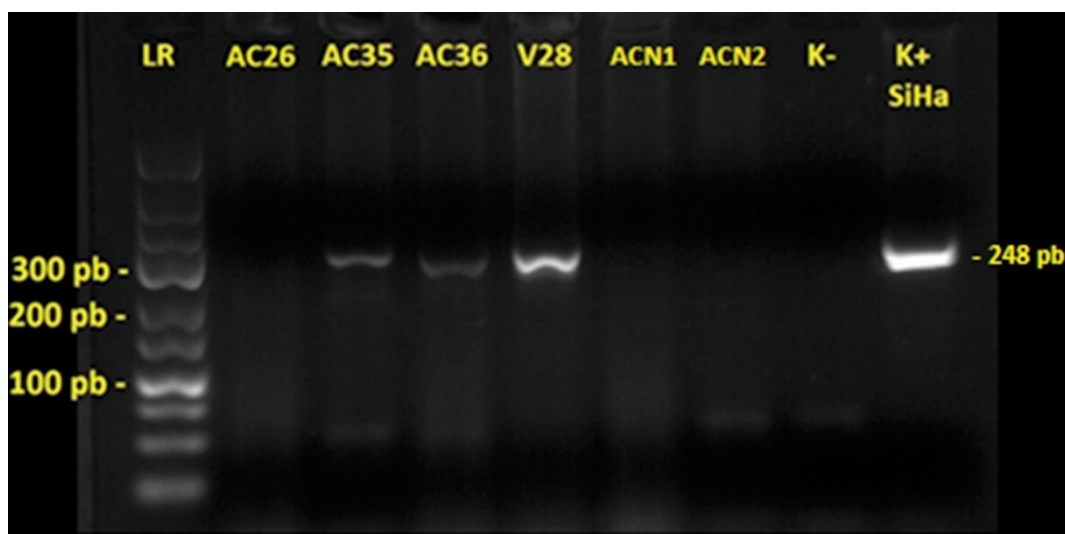
Tab. 13 Přehledová tabulka výsledků elektroforézy ampliconů L1 (150 pb) a E6 (248 pb) spolu s genotypy HPV u jednotlivých vzorků.

Označení vzorku	L1 (150 pb)	Typ HPV	E6 DNA (248bp)	Označení vzorku	L1 (150 pb)	Typ HPV	E6 DNA (248bp)	Označení vzorku	L1 (150 pb)	Typ HPV	E6 DNA (248bp)
V1T	-	16	+	C1T	+	39	-	AC12	+	16	+
V2T	-	-	-	C2T	+	16	+	AC26	-	-	-
V3T	-	-	-	C2N	-	-	-	AC34	-	-	-
V5T	+	16	+	C3T	+	16	-	AC35	+	16	+
V7T	-	-	-	C5T	+	16	+	AC36	+	16	+
V10T	+	16	+	C6T	+	16	+	AC37	+	16	+
V10N	+	16	-	C9N	-	-	-	AC38	+	16	+
V12T	-	-	-	C12T	+	45	-	AC39	+	16	+
V12N	-	-	-	C12N	+	45	-	AC40	+	16	+
V13T	-	-	-	C15T	+	16	+	AC41	+	16	+
V13N	-	-	-	C18T	+	16	+	AC42	+	16	+
V14T	-	-	-	C19T	+	16	+	AC43	+	16,18,44	+
V14N	-	-	-	C20	+	16	+	AC44	+	16	+
V15T	-	-	-	C4T	+	16	+	AC45	+	16	+
V11	-	-	-	C13T	+	16	-	AC46	+	16	+
V16T	+	16	+	C21N	-	-	-	AC47	+	16	+
V17T	+	16	+	C22N	-	-	-	AC48	-	-	-
V18T	+	16	+	C23N	-	-	-	AC49	+	16	+
V19N	-	-	-					AC50	+	16	+
V20N	-	-	-					ACN1	-	-	-
V21N	-	-	-					ACN2	-	-	-
V22	-	-	-								
V23	-	-	-								
V24	-	-	-								
V25	-	-	-								
V26	-	-	-								
V27	+	16	+								
V28	+	16	+								
V29	-	-	-								

6.3 Detekce genu E6 HPV16

Na DNA všech izolovaných vzorků jsem provedla detekci genu E6 pro papilomavirus typu 16 (Obr. 13) (Tab. 13).

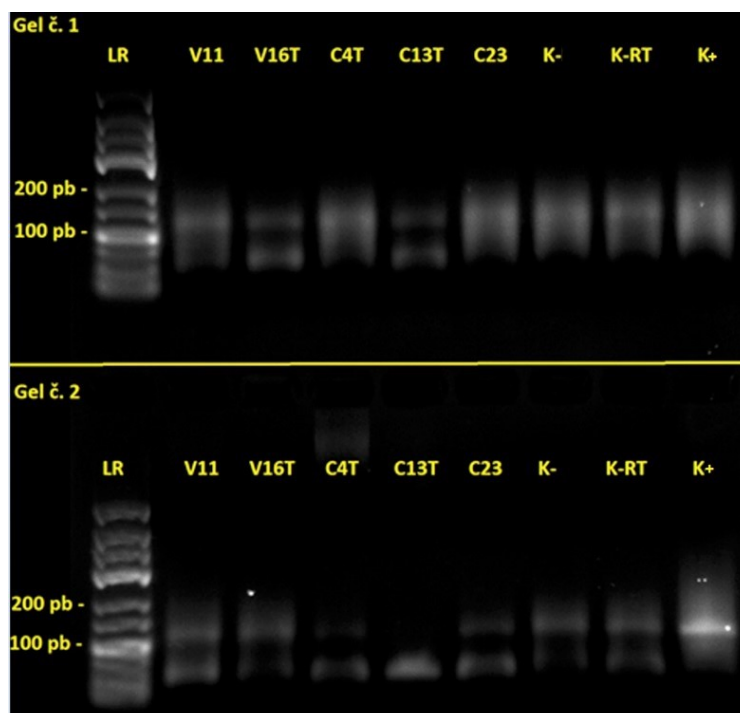
Z celkem 35 vzorků pozitivních na HPV16, bylo 32 (91 %) vzorků pozitivních také na PCR s primery pro gen E6. Pouze vzorky C3T, C13T a V10N, které patřily mezi pozitivní na HPV16, byly i po druhém opakování PCR oblasti E6 negativní. Důvodem může být vysoká fragmentace DNA u těchto vzorků, při kontrolní PCR amplikony vzorku C3T a C13T dosahovaly maximální délky 100 pb, u vzorku V10N dosahovaly maximální délky 200 pb (Kap. 6.1.1). Ze 30 vzorků, které na typizaci vyšly negativní na přítomnost papilomaviru, se všechny potvrdily jako negativní pro gen E6 HPV16. Tři vzorky (C1T, C12T, C12N) pozitivní na jiný typ HPV, než je HPV16, také správně nevykazovaly přítomnost genu E6 HPV16.



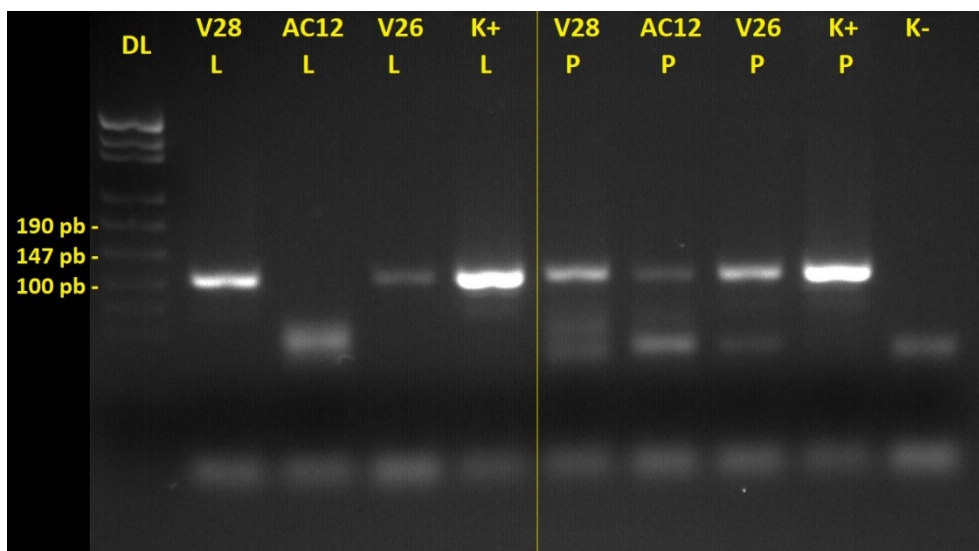
Obr. 13 Produkty amplifikace genu E6 (248 pb). Amplikony délky 248 pb jsou posunuty, kvůli odlišné koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku a žebříčku a její vazbě na GelRed, který tak mění jejich mobilitu. Správnost amplikonů již byla v naší laboratoři prověřena. LR – GeneRuler Low Range DNA, K- – negativní kontrola, K+ – pozitivní kontrola SiHa DNA.

6.4 Průkaz aktivní infekce HPV

Pro charakterizaci vzorků jsem také prováděla detekci aktivní transkripce virového onkogenu E6. K reverzní transkripci jsem nejprve použila reverzní transkriptázy SCRIPT Reverse Transcriptase a M-MLV Reverse Transcriptase, ale při kontrolní PCR pro β -globin nevznikaly žádné či vznikaly pouze nespecifické produkty (Obr. 14). Následně jsem na vzorcích vulvy a anu provedla porovnání dalších reverzních transkriptáz LunaScript® RT SuperMix Kit a ProtoScript® II Reverse Transcriptase. Také jsem zkusila změnit detekovaný gen pro kontrolní PCR na HPRT. Při kontrolní PCR (HPRT 117 pb) jsem dosáhla lepších výsledků s reverzní transkriptázou ProtoScript II (Obr. 15), proto jsem ji následně použila k reverzní transkripci vzorků předběžně vybraných pro sekvenování, ale pouze 2 (AC12, AC35) z 21 vybraných vzorků byly HPRT pozitivní (Tab. 14). U 5 vzorků (AC12, AC34, AC35, ACN1 a ACN2) jsem také znovu zkusila kontrolní PCR pro β -globin a detekovala pozitivní pouze dva vzorky AC34 a ACN2 (Tab.14).



Obr. 14 Vizualizace kontrolní PCR po reverzní transkripci pro β -globin (110 pb). Gel č.1 – reverzní transkripce provedena SCRIPT Reverse Transcriptase, gel č. 2 – transkripce provedena M-MLV Reverse Transcriptase, LR – GeneRuler Low Range DNA Ladder, K- – negativní kontrola PCR, K- – negativní kontrola reverzní transkripce, K+ – pozitivní kontrola SiHa.



Obr. 15 Vizualizace výsledků PCR s HPRT primery na cDNA (117 pb) za použití dvou různých reverzních transkriptáz. L – LunaScript® RT SuperMix Kit, P – ProtoScript® II Reverse Transcriptase, K+ – SiHa, K- – negativní kontrola, DL – žebříček pUC19 DNA/MspI

Aktivní transkripci virového onkogenu detekcí mRNA E6 se mi podařilo potvrdit pouze u 2 vzorků (AC12, AC35). U vzorků AC34, AC48 a ACN2 vyšla kontrolní PCR pozitivní, ale detekce mRNA E6 negativní, což potvrdilo absenci aktivní HPV infekce v těchto vzorcích. U zbylých 16 vzorků vyšla kontrolní PCR negativní, proto jsem u nich použila ověření aktivní transkripce virových onkogenů s využitím dvojité positivity, a to imunohistochemické detekce proteinu p16 a detekcí HPV DNA (E6 a/nebo L1) (Tab. 8). Pokud jsou oba tyto faktory pozitivní, je možné infekci papilomavirem analogicky k HNSCC označit jako aktivní.

Aktivní infekce byla určena u 8 z 21 vybraných vzorků vulvy, cervixu a anu určených k sekvenování nové generace.

Tab. 14 Přehled vzorků odeslaných na NGS a jejich charakteristika s výsledky analýz potvrzující aktivní infekci HPV16. N – analýza neprovedena, šedé značení – výsledky potvrzující aktivní transkripci onkogenů.

Označení vzorku	Typ HPV (RLB)	HPRT cDNA (117 pb)	E6 cDNA (86pb)	β -globin cDNA (110pb)	p16	E6 DNA (248 pb)	Aktivní infekce HPV
V16T	16	-	-	N	+	+	+
V17T	16	-	-	N	+	+	+
V18T	16	-	-	N	+	+	+
V3T	-	-	-	N	-	-	-
V15T	-	-	-	N	-	-	-
V11	-	-	-	N	-	-	-
V19N	-	-	-	N	-	-	-
V20N	-	-	-	N	-	-	-
V21N	-	-	-	N	-	-	-
C19T	16	-	-	N	+	+	+
C4T	16	-	-	N	+	+	+
C13T	16	-	-	N	+	-	+
C21N	-	-	-	N	-	-	-
C22N	-	-	-	N	-	-	-
C23N	-	-	-	N	-	-	-
AC12	16	+	+	-	N	+	+
AC35	16	+	+	-	+	+	+
AC34	-	N	-	+	N	-	-
AC48	-	+	-	N	N	-	-
ACN1	-	-	-	-	-	-	-
ACN2	-	+	-	+	-	-	-

6.5 Sekvenování nové generace – analýza a statistické zpracování dat

Všechny vzorky byly vybrány k sekvenaci na základě typu tkáně, genotypu papilomavirů (HPV16) s ohledem na aktivní transkripci onkogenů HPV a dostatečného množství RNA pro sekvenaci.

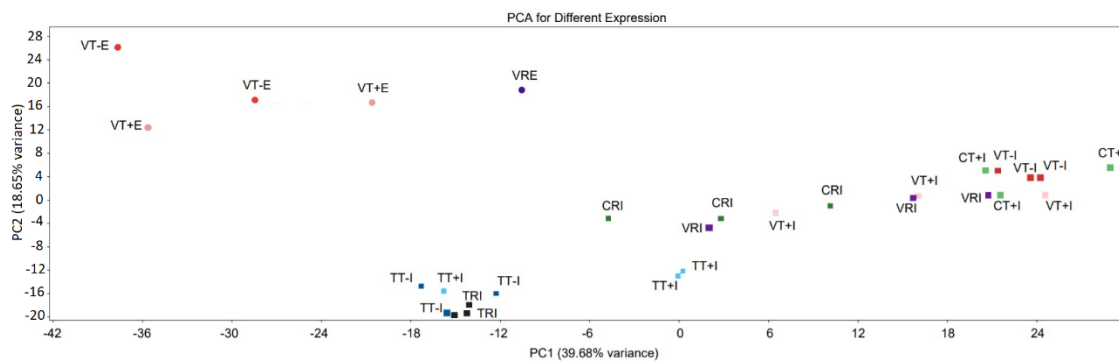
K sekvenování bylo použito celkem 30 vzorků (Tab. 15). V Chorvatsku byly sekvenovány vzorky vulvy, cervixu a tonsil, které zahrnovaly nádorovou tkáň pozitivní na HPV16, nádorovou tkáň negativní pro HPV a zdravou tkáň. Vzorky anální tkáně a část překrývajících se vulvárních vzorků bylo sekvenováno v Německu.

Soubor dat vulv, cervixu a tonsil zahrnoval vždy tři vzorky od každého typu tkáně s ohledem na přítomnost HPV. Anální karcinomy obsahovaly vzorky pouze po dvou od každého typu tkáně, kvůli nedostatku vzorků zdravé tkáně a vzorků nádoru bez přítomnosti HPV, ze kterých jsem byla schopna připravit dostatek kvalitní RNA. Všechna data diferenciální exprese miRNA byla stanovena porovnáním nádorové tkáně, s přihlédnutím na HPV status, se zdravou tkání stejné lokalizace, která sloužila jako referenční.

Tab. 15 Charakterizace vzorků analyzovaných sekvenováním nové generace, použitých k určení profilů diferenciální exprese miRNA. IRB – Ruđer Bošković Institute (Chorvatsko), EMBL – European Molecular Biology Laboratory (Německo), T – tumor, Z – zdravá tkáň, N – analýza neprovedena, + pozitivní, - negativní, +/- slabě pozitivní.

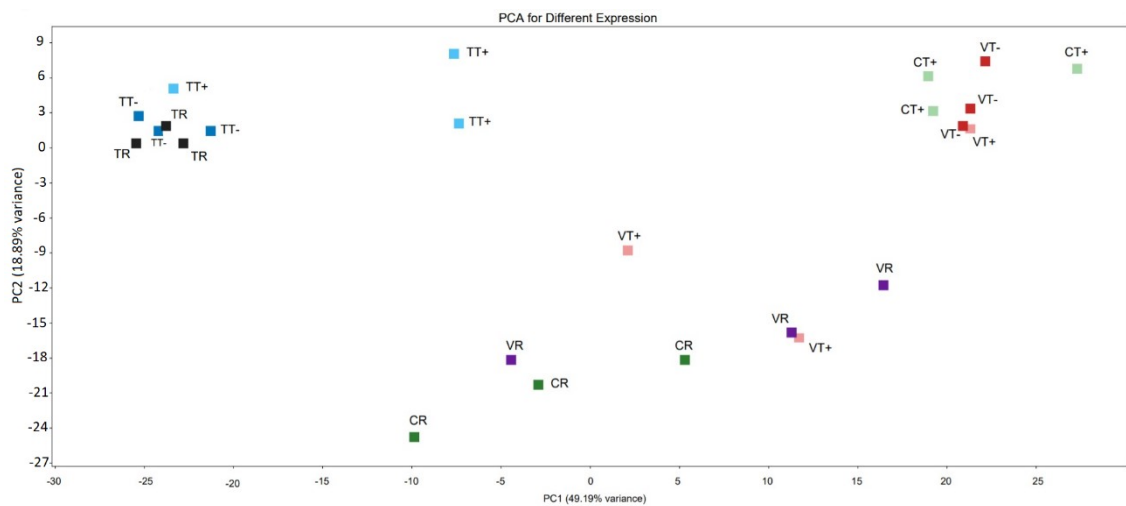
Vzorek	Označení	Lokalizace	Typ tkáně	Místo sekvenace	RNA (ng/μl)	RNA A260/280	HPRT cDNA (117 pb)	E6 cDNA (86pb)	β-globin cDNA (110pb)	p16	Aktivní infekce HPV	DNA (ng/μl)	DNA A260/280	LT (150 pb)	Typ HPV	β-globin RLB DNA (240pb)	E6 DNA (248pb)	GAPDH 100 pb	GAPDH 200 pb	GAPDH 300 pb	GAPDH 400 pb	β-globin DNA (110pb)
V16T	VT+	vulva	T	IRB	513,50	1,86	-	-	N	+	+	181,80	1,85	+	16	N	+	+	+	+	-	N
V17T	VT+	vulva	T	IRB	426,90	1,90	-	-	N	+	+	350,40	1,87	+	16	N	+	+	+	-	-	N
V18T	VT+	vulva	T	IRB	362,70	1,94	-	-	N	+	+	362,40	1,84	+	16	N	+	+	+	+	+	N
V3T	VT-	vulva	T	IRB	262,00	1,94	-	-	N	-	-	160,70	1,82	-	-	N	-	+	+	-	-	N
V15T	VT-	vulva	T	IRB	224,90	1,91	-	-	N	-	-	243,20	1,82	-	-	N	-	+	+	-	-	N
V11	VT-	vulva	T	IRB	160,10	1,86	-	-	N	-	-	71,30	1,76	-	-	N	-	+	+	-	-	N
V19N	VR	vulva	Z	IRB	113,70	1,85	-	-	N	-	-	316,30	1,88	-	-	N	-	+	+	+	+	N
V20N	VR	vulva	Z	IRB	505,80	1,89	-	-	N	-	-	224,00	1,86	-	-	N	-	+	+	+	+	N
V21N	VR	vulva	Z	IRB	210,90	1,89	-	-	N	-	-	206,00	1,85	-	-	N	-	+	+	+	+	N
C19T	CT+	cervix	T	IRB	511,30	1,92	-	-	N	+	+	42,50	1,93	+	16	N	+	+	+	+	+	N
C4T	CT+	cervix	T	IRB	232,50	1,92	-	-	N	+	+	656,00	1,83	+	16	N	+	+	+	+	+	N
C13T	CT+	cervix	T	IRB	263,20	1,90	-	-	N	+	+	184,00	1,82	+	16	N	-	+	-	-	-	N
C21N	CR	cervix	Z	IRB	553,10	1,93	-	-	N	-	-	957,90	1,86	-	-	N	-	+	+	+	+	N
C22N	CR	cervix	Z	IRB	394,50	1,87	-	-	N	-	-	562,80	1,86	-	-	N	-	+	+	+	+	N
C23N	CR	cervix	Z	IRB	366,50	1,91	-	-	N	-	-	324,10	1,87	-	-	N	-	+	+	+	+	N
FFPE1	TT+	tonsila	T	IRB	392,20	1,91	N	+	+	N	+	417,40	1,80	-	16	+	+	N	N	N	N	+
FFPE13	TT+	tonsila	T	IRB	315,30	1,91	N	+	+	N	+	205,70	1,82	+	16	+	+	N	N	N	N	+
FFPE30	TT+	tonsila	T	IRB	236,20	1,95	N	+	+	N	+	237,10	1,80	+	16	+	+	N	N	N	N	+
FFPE60	TT-	tonsila	T	IRB	107,60	1,84	N	-	+	N	-	80,00	1,83	-	-	+	-	N	N	N	N	+
FFPE62	TT-	tonsila	T	IRB	94,30	1,96	N	-	+	N	-	33,80	1,82	-	-	+	-	N	N	N	N	+
FFPE63	TT-	tonsila	T	IRB	434,60	1,96	N	-	+	N	-	192,10	1,82	-	-	+	-	N	N	N	N	+
ORL128	TR	tonsila	Z	IRB	312,90	N	N	N	N	-	-	280,80	N	-	-	+	N	N	N	N	N	N
ORL124	TR	tonsila	Z	IRB	298,70	N	N	N	N	-	-	717,70	N	-	-	+	N	N	N	N	N	N
ORL118	TR	tonsila	Z	IRB	293,40	N	N	N	N	-	-	418,60	N	-	-	+	N	N	N	N	N	N
AC12	AT+	anus	T	EMBL	117,70	1,75	+	+	-	N	+	622,00	1,97	+	16	N	+	+	+	-	-	N
AC35	AT+	anus	T	EMBL	65,90	1,43	+	+	-	+	+	152,30	1,94	+	16	N	+	+	+	-	-	N
AC34	AT-	anus	T	EMBL	134,60	1,97	N	-	+	N	-	20,30	1,88	-	-	N	-	+	+	-	-	N
AC48	AT-	anus	T	EMBL	268,20	1,96	+	-	N	N	-	2514,30	2,01	-	-	N	-	+	+	-	-	N
ACN1	AR	anus	Z	EMBL	117,60	1,91	-	-	-	-	-	678,40	2,02	-	-	N	-	+	+	-	-	N
ACN2	AR	anus	Z	EMBL	317,20	1,91	+	-	+	-	-	113,00	1,96	-	-	N	-	+	+	+	+	N

Vzhledem k tomu, že příprava knihoven pro sekvenování probíhala za použití dvou odlišných kitů a stejně tak samotná sekvenace byla provedena dvěma různými sekvenátory, nechala jsem v Německu spolu s análními karcinomy sekvenovat také část již analyzovaných vulvárních vzorků, které dále nebyly zahrnuty do analýzy diferenciální exprese miRNA. Tyto vzorky vulv sloužily k porovnání variability mezi odlišnými technologiemi a postupy přípravy knihoven pro sekvenování, jak je vidět na obrázku 16, kde jsem z dat relativní exprese miRNA vzorků vulv z Německa a vzorků analyzovaných v Chorvatsku vytvořila PCA graf. Ten vzorky rozděluje podle jejich první největší variability (PC1) a podle druhé největší variability (PC2). V grafu je vidět, že vzorky sekvenované v Německu se shlukují v odlišné části než vzorky zpracované v Chorvatsku, navzdory tomu, že se jedná o vzorky stejné (vulvární) lokalizace. Z těchto výsledků vyplývá, že odlišná metodologie přípravy sekvenační knihovny a vlastní sekvenace (Kap. 5.6) vnáší do výsledků chybu, důsledkem čehož jsou vzorky ve společné analýze neporovnatelné. Proto jsem, do závěrečné analýzy porovnávání diferenciální exprese miRNA mezi různými typy tkání nezařadila, vzorky análních karcinomů, které byly sekvenovány v Německu a netvořily soubor dat o stejném počtu replikátů jako data vzorků zpracovaných v Chorvatsku. Diferenciální exprese miRNA v análních karcinomech byla analyzována odděleně pouze pro tyto vzorky.



Obr. 16 Analýza hlavních komponent (PCA). Porovnání expresních profilů miRNA mezi vzorky zpracovanými v Německu (značeno kolečkem) a v Chorvatsku (značeno kostkou). VT+E – HPV+ nádorová tkáň vulv (Německo), VT-E – HPV- nádorová tkáň vulv (Německo), VRE – referenční tkáň vulv (Německo), VT+I – HPV+ nádorová tkáň vulv (Chorvatsko), VT-I – HPV- nádorová tkáň vulv (Chorvatsko), VRI – referenční zdravá tkáň vulv (Chorvatsko), TT+I – HPV+ nádorová tkáň tonsil (Chorvatsko), TT-I – HPV- nádorová tkáň tonsil (Chorvatsko), TRI – referenční zdravá tkáň tonsil (Chorvatsko), CT+I – HPV+ nádorová tkáň cervixu (Chorvatsko), CRI – referenční zdravá tkáň cervixu (Chorvatsko).

Z dat expresních profilů miRNA získaných v Chorvatsku, jsem nejprve vytvořila PCA graf (Obr. 17), který ukazuje výraznou variabilitu mezi tkání tonsil a zbylými typy tkání vulvy a cervixu. Samotné tonsily tvoří dva shluky, a to z tonsil negativních na HPV, které jsou v překryvu s referenční zdravou tkání tonsil, a z tonsil pozitivních na HPV. Jeden vzorek tonsil pozitivních na HPV je však výrazně odlehlý a zasahuje do druhého shluku z nádorové tkáně tonsil negativních na HPV a zdravé tonsilární tkáně. Vulvární nádorová tkáň negativní na HPV také tvoří jeden shluk, který se překrývá s cervikální nádorovou tkání pozitivní na HPV. Oba tyto shluky jsou odděleny od jejich referenční zdravé tkáně. Pouze nádorová tkáň vulv pozitivní na HPV je distribuována nepravidelně mezi referenční zdravou tkání a nádory vulvy negativních na HPV.



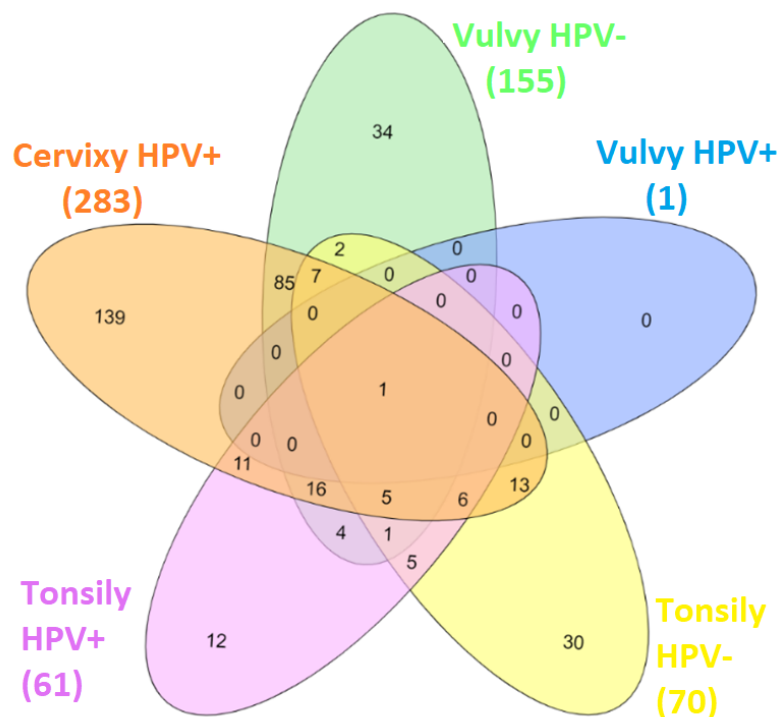
Obr. 17 Analýza hlavních komponent (PCA) expresních profilů miRNA mezi vzorky zpracovanými v Chorvatsku. TT+ – HPV+ nádorová tkáň tonsil, TT- – HPV- nádorová tkáň tonsil, TR – referenční zdravá tkáň tonsil, VT+ – HPV+ nádorová tkáň vulv, VT- – HPV- nádorová tkáň vulv, VR – referenční zdravá tkáň vulv, CT+ – HPC+ nádorová tkáň cervixu, CR – referenční zdravá tkáň cervixu.

Zpracovaná data s diferencíální expresí miRNA pro jednotlivé typy tkání jsou k nahlédnutí v příloze 1. Největší množství diferencíálně exprimovaných miRNA bylo zjištěno u cervixu, a to 283 miRNA z nichž 140 (49 %) mělo sníženou expresi a 143 (51 %) zvýšenou expresi (Obr. 19). Naopak u vulvární tkáně pozitivní na HPV, byla nalezena pouze jedna miRNA se statisticky významnou diferencíální expresí (miRNA-451a), která navíc byla společná pro všechny testované tkáně. Tato miRNA měla sníženou expresi vzhledem k referenční zdravé tkáni (Obr. 18). Minimální rozdíly mezi expresními profily jsou také patrné na PCA grafu (Obr. 17), kde vulvární tkáň

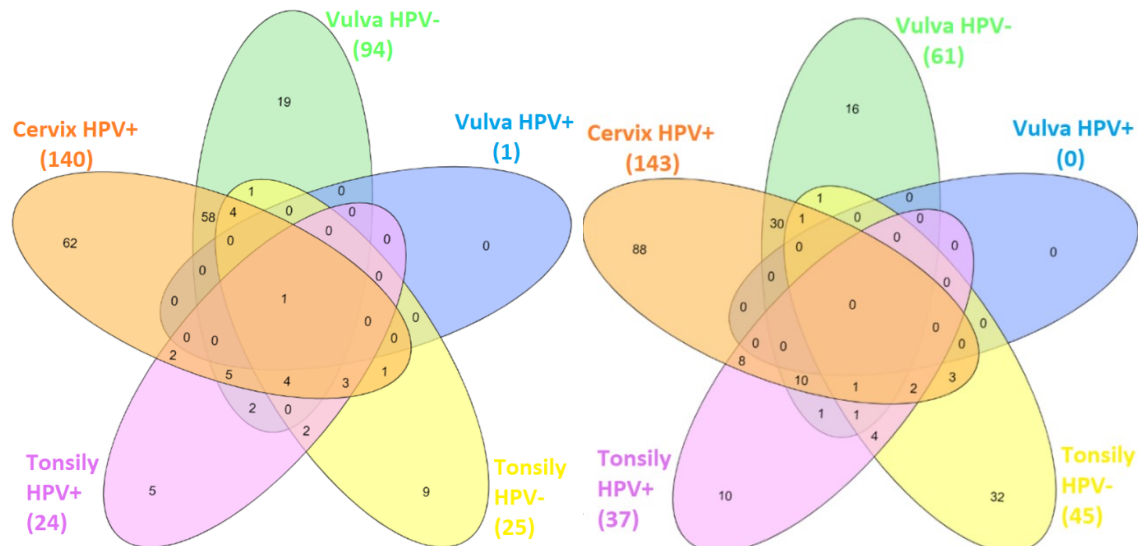
pozitivní na HPV tvoří překryv s vulvární zdravou referenční tkání. Ve vulvách negativních na HPV bylo 155 diferencióálně exprimovaných miRNA, 94 (61 %) z nich mělo sníženou expresi a 61 (39 %) zvýšenou expresi (Obr. 19). Tonsilární tkáň pozitivní na HPV měla velmi podobné poměry mezi miRNA se sníženou expresí a miRNA s expresí zvýšenou jako tkáň tonsil negativní na HPV. V tonsilách pozitivních na HPV bylo 61 miRNA s diferencióální expresí, z nichž 24 (39 %) mělo expresi sníženou a 37 (61 %) expresi zvýšenou. Tonsily negativní na HPV měly celkem 70 diferencióálně exprimovaných miRNA, 25 (36 %) miRNA se sníženou a 45 (64 %) miRNA se zvýšenou expresí (Obr. 19).

Diferencióální exprese miRNA u análních karcinomů byla analyzovaná odděleně od vzorků vulvy, cervixu a tonsil. Množství diferencióálně exprimovaných miRNA v análních karcinomech u karcinomů pozitivních na HPV a karcinomů negativních na HPV bylo velmi podobné. Ze 71 miRNA v nádorech negativních na HPV mělo 39 (55 %) miRNA sníženou expresi a 32 (45 %) miRNA zvýšenou expresi. U análních nádorů pozitivních na HPV bylo celkem 77 diferencióálně exprimovaných miRNA, z nichž 37 (48 %) miRNA mělo sníženou expresi a 40 (52 %) miRNA zvýšenou expresi.

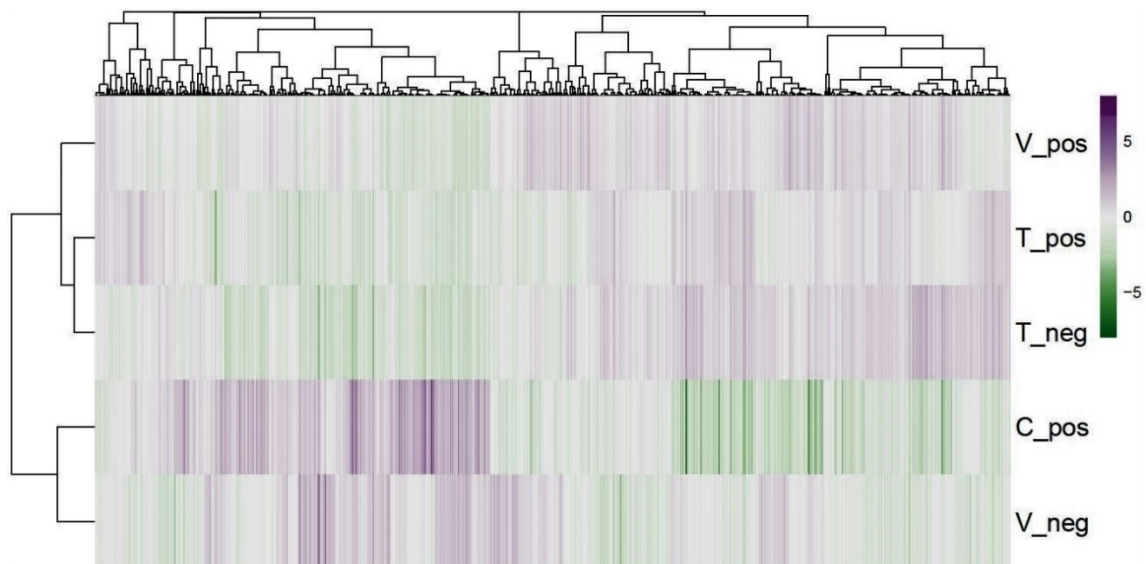
Značný překryv diferencióálně exprimovaných miRNA se objevil mezi vulvárními tumory negativními na HPV a cervikálními tumory pozitivními na HPV. Překryv byl nejvýraznější jak u miRNA se sníženou expresí, tak u miRNA se zvýšenou expresí (Obr. 18 a obr. 20). Z dat vyplývá, že nebyla nalezena žádná miRNA s diferencióální expresí specifickou pouze pro nádory pozitivní na HPV tzv. HPV-core miRNA (Obr. 18). Překryvem mezi tonsilami a cervixy pozitivními na HPV je 11 miRNA specifických pouze pro tkáň pozitivní na HPV (Obr. 18). HPV-core miRNA pro nádory všech studovaných lokalizací není možné určit kvůli nedostatku zjištěných deregulovaných miRNA ve vulvách pozitivních na HPV. Při hledání překryvu pro miRNA s diferencióální expresí pouze v tkáni pozitivní na HPV mezi vzorky cervixu, tonsil a anu, jsem detekovala tři miRNA. Jedna je miRNA se sníženou expresí (miR-139-5p) a dvě miRNA se zvýšenou expresí: miR-4508 a miR-663a (Příloha 1).



Obr. 18 Vennův diagram zobrazující překryvy diferenciálně exprimovaných miRNA. Zahrnuti jsou miRNA jak se sníženou, tak se zvýšenou diferenciální expresí miRNA v pěti různých typech tkání vulvy, cervixu a tonsil. p adj $\leq 0,1$; \log_2 hodnoty změny exprese FC (fold-change) $> 1,58$.



Obr. 19 Vennovy diagramy zobrazující překryv diferenciálně exprimovaných miRNA v pěti typech tkání vulvy, cervixu a tonsil. Levý obrázek zobrazuje překryv miRNA se sníženou expresí, pravý obrázek zobrazuje překryv miRNA se zvýšenou expresí miRNA. p adj $\leq 0,1$; \log_2 hodnoty změny exprese FC (fold-change) $> 1,58$.



Obr. 20 Mapa diferenciální exprese miRNA. Osa x – jednotlivé geny miRNA, osa y – typy tkání. V_pos – HPV+ nádorová tkáň vulv, V_neg – HPV- nádorová tkáň vulv, T_pos – HPV+ nádorová tkáň tonsil, T_neg – HPV- nádorová tkáň tonsil, C_pos – HPV+ nádorová tkáň cervixu. Barevné spektrum od tmavě zelené přes bílou po tmavě fialovou barvu zobrazuje hodnotu dvojkového logaritmu změny exprese v nádorové tkáni vzhledem k referenční zdravé tkáni (Kap. 5.7). Zelená znázorňuje sníženou expresi miRNA a fialová zvýšenou expresi miRNA (viz legenda).

6.6 Ověření exprese miRNA v buněčných liniích

Diferenciální expresi vybraných miRNA jsem ověřila pomocí RT-qPCR s využitím TaqMan microRNA sond a příslušných primerů na pěti buněčných liniích (Kap. 5.10), z nichž dvě jsou odvozené od nádorů pozitivních na HPV (CRL-3240, SiHa), dvě linie jsou nádorové negativní na HPV (CCL-138, FaDu) a jednu buněčnou linii představují imortalizované keratinocyty HaCaT také negativní na HPV. SONDY pro miR-9-5p, miR-20b, miR-199a-3p a miR-21* byly vybrány na základě literatury a výsledků předešlé studie Vojtěchové a kol. (Lajer *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). Sonda miR-139-5p byla vybrána na základě mých výsledků NGS a literatury a sonda RNU48 byla použita jako referenční sonda s nejstabilnější expesí, a také byla vybrána na základě srovnání s literaturou a prací Vojtěchové a kol.

Nejprve jsem pro všechny vybrané sondy určila standardní křivky (Tab.16), pomocí kterých jsem stanovila optimální hodnoty prahu detekce a provedla kontrolu efektivity amplifikačních reakcí. Kvantifikace je založena na předpokladu, že při 100% efektivitě amplifikace se v každém cyklu PCR zdvojnásobí množství produktu. Pokud efektivita reakce nedosahuje 100 %, liší se množství vznikajícího produktu. Proto jsem pro všechny reakce následně provedla korekci účinnosti. Efektivita amplifikace PCR reakcí pro následnou relativní kvantifikace by se měla pohybovat mezi 90 % - 110 % (Applied Biosystems, 2006).

Standardní křivku a práh detekce jsem stanovila pro sondy RNU48, miR-9-5p a miR-20b na buněčné linii SiHa a pro sondy miR-199a-3p a miR-21* na buněčné linii CRL-3240. Standardní křivku se mi nepodařilo stanovit na žádné buněčné linii u sondy miR-139-5p, jejíž exponenciální fáze amplifikační křivky u neřaděného vzorku cDNA začínala ve 30. cyklu PCR reakce a mezi triplicáty se objevovala variace vyšší než 50 %.

Vzorky jsem nanášela v triplicátech. Výsledné amplifikační křivky jsem analyzovala pomocí programu RotorGene 6000. Nastavením příslušné hodnoty prahu detekce jsem stanovila hodnoty Ct, což je číslo cyklu, ve kterém dochází k překročení prahu fluorescence (Tab. 17). Pro následné zpracování dat bylo nutné doplnit chybějící Ct hodnoty v triplicátu příslušného vzorku, ty jsem nahradila průměrem detekovaných Ct hodnot daného vzorku či jednou detekovanou hodnotou (Goni *et al.*, 2009).

Tab. 16 Přehled hodnot prahu detekce a efektivit amplifikačních reakcí stanovených pomocí standardních křivek pro jednotlivé TaqMan MicroRNA sondy.

TaqMan sondy	Buněčná linie	Hodnota prahu detekce	Efektivita
RNU48	SiHa	0,00817	0,90
miR-9-5p	SiHa	0,01200	0,99
miR-20b	SiHa	0,01840	0,99
miR-199a-3p	CRL-3240	0,12240	1,16
miR-21*	CRL-3240	0,04979	1,05

Tab. 17 Přehled Ct hodnot použitých pro analýzu exprese miRNA. Vzorky jsou analyzovány v triplicátech s použitím 3 × ředění cDNA z příslušných buněk. Hodnoty značené • nebyly detekovány a jsou doplněny průměrem Ct hodnot dvou vzorků či nahrazeny jednou detekovanou hodnotou (Goni *et al.*, 2009).

vzorky	hsa-miR-9	hsa-miR-199a	hsa-miR-21*	hsa-miR-20b	RNU48
CRL-3240	21,28	37,89	27,05	22,21	21,72
CRL-3240	21,19	36,89•	27,59	22,14	21,74
CRL-3240	21,05	35,88	27,38	22,05	21,80
CCL-138	29,23	37,27•	29,58	28,12	21,56
CCL-138	29,07	36,52	29,78	28,39	21,61
CCL-138	28,59	38,02	29,64	28,18	21,72
SiHa	24,02	38,91•	27,87	27,46	19,90
SiHa	24,20	38,31	28,39	27,20	20,54
SiHa	23,90	39,51	28,21	27,38	20,24
FaDu	26,27	37,78•	28,83	27,99	18,92
FaDu	25,81	37,78•	29,06	27,82	18,78
FaDu	25,88	37,78	28,58	27,89	18,86
HaCaT	28,53	38,32	28,49	28,07	20,53
HaCaT	28,69	38,78	28,79	28,12	20,46
HaCaT	28,26	37,64	28,38	28,42	20,30

V softwaru GenEx jsem provedla korekci efektivity amplifikace, určila průměr triplikátů Ct hodnot a provedla normalizaci dat pro jednotlivé vzorky porovnáním s expresí referenční RNA RNU48 (stanovení $\Delta Ct_{\text{vzorku}} = Ct_{\text{studovaná miRNA}} - Ct_{\text{referenční miRNA (RNU48)}}$) (Tab. 18).

Tab. 18 Přehled hodnot ΔCt .

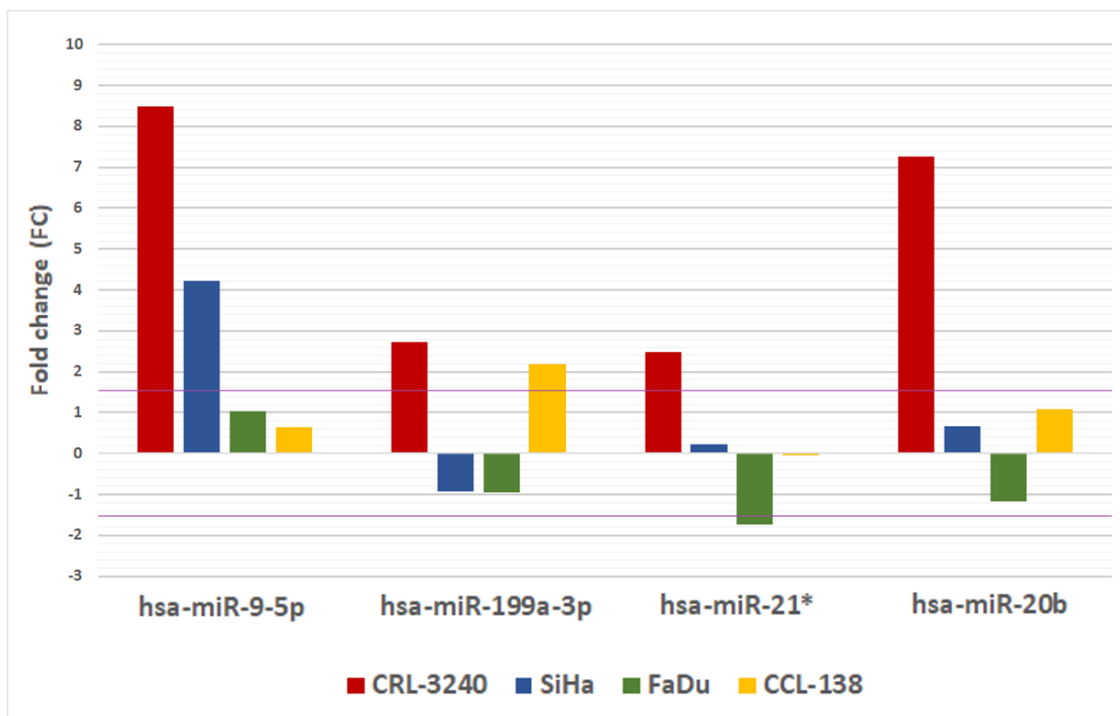
vzorky	hsa-miR-9	hsa-miR-199a	hsa-miR-21*	hsa-miR-20b
CRL-3240	0,88	20,84	8,17	1,83
CCL-138	8,73	21,38	10,70	8,00
SiHa	5,14	24,50	10,43	8,50
FaDu	8,34	24,52	12,39	10,24
HaCaT	9,37	23,58	10,65	9,08

Následně jsem provedla relativní kvantifikaci exprese sledovaných miRNA v buněčných liniích pozitivních na HPV a negativních na HPV ve srovnání s buněčnou linií HaCaT (Tab. 19), čímž jsem určila hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2), tedy \log_2 hodnoty změny exprese FC (fold change) studovaných miRNA. Významná hodnota změny exprese miRNA byla definována stejně jako u NGS $>1,58$. Kladné hodnoty představují zvýšenou expresi miRNA a záporné hodnoty sníženou expresi miRNA v porovnání s referenční buněčnou linií HaCaT.

Tab. 19 Přehledová tabulka hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2).

vzorky	hsa-miR-9	hsa-miR-199a	hsa-miR-21*	hsa-miR-20b
CRL-3240	8,50	2,74	2,48	7,25
CCL-138	0,64	2,20	-0,04	1,08
SiHa	4,23	-0,93	0,22	0,66
FaDu	1,03	-0,94	-1,74	-1,16

Na obrázku 21 je zobrazena relativní exprese miRNA v jednotlivých buněčných liniích v porovnání s buněčnou linií HaCaT ($\log_2= 0$). Exprese všech testovaných miRNA byla zvýšená nad stanovenou hranici FC v hypofaryngeální buněčné linii CRL-3240. Potvrdila jsem podle předpokladu zvýšenou expresi miR-9-5p v buněčných liniích pozitivních na HPV (hypofaryngeální CRL-3240 FC = 8,50, cervikální SiHa FC = 4,23). MiR-199a-3p měla zvýšenou expresi v buněčné linii CRL-3240 (FC = 2,74) i CCL-138 (FC = 2,20), tedy bez ohledu na tkáňovou specifitu či pozitivitu na HPV. Exprese miR-21* byla zvýšená v buněčné linii CRL-3240 (FC = 2,48) a naopak snížena v buněčné linii FaDu (FC = -1,74), která je negativní na HPV. Zvýšenou expresi miR-20b jsem pozorovala pouze v buněčné linii CRL-3240 (FC = 7,25).



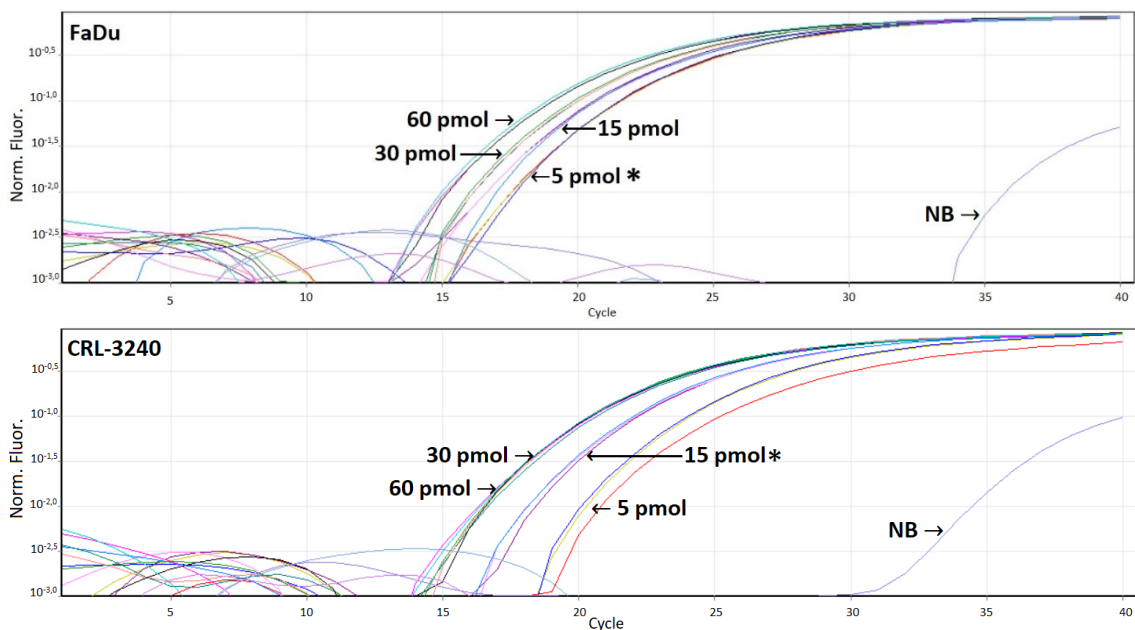
Obr. 21 Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) pro jednotlivé miRNA v buněčných liniích. Osa x – jednotlivé miRNA, osa y – fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2)). Fialová linie určuje \log_2 hodnoty změny exprese FC (fold-change) $>1,58$.

6.7 Ověření transfekce mimikujícími/inhibujícími miRNA

K transfekci miRNA jsem použila buněčné linie CRL-3240 a FaDu. Tyto linie jsem vybrala, protože obě pochází z hypofaryngeálního karcinomu a liší se přítomností HPV. CRL-3240 je linie pozitivní na HPV a linie FaDu negativní na HPV. K transfekci buněk CRL-3240 jsem vybrala mimikující miR-139-5p a inhibitor miR-9-5p, k transfekci buněčné linie FaDu jsem použila mimikující miR-9-5p (Kap. 5.11). MiR-139-5p jsem vybrala na základě svých výsledků NGS diferenciální exprese miRNA u nádorů hlavy a krku, i přestože se mi u ní nepodařilo ověřit expresi na buněčných liniích (Kap. 6.6), což mohlo být právě způsobeno sníženou expresí této miRNA. Zvýšenou expresi miR-9-5p se mi úspěšně podařilo potvrdit u buněčných linií pozitivních na HPV.

Před samotnou transfekcí jsem provedla několik optimalizačních testů, kterými jsem zjistila ideální množství nasazených buněk na 6-jamkovou destičku pro konkrétní buněčné linie a množství transfekované miRNA. Na 6-jamkové destičce jsem kultivovala 25×10^3 , 50×10^3 , 10×10^4 , 20×10^4 , 50×10^4 a 1×10^6 buněk po dobu 4 dnů a po každých 24 h jsem je kontrolovala pod mikroskopem. Pro transfekci jsem následně použila 15×10^4 buněk CRL-3240 a 10×10^4 buněk FaDu.

K optimalizaci transfekce mimikující miRNA doporučené výrobcem jsem použila pozitivní kontrolu miR-1 v látkovém množství 5 pmol, 15 pmol, 30 pmol a 60 pmol v buněčné linii FaDu a CRL-3240 (Obr. 22). MiR-1 je exprimovaná pouze v lidských svalových buňkách a je doporučena výrobcem jako pozitivní kontrola. Před transfekčními pokusy jsem ověřila, že v mých buňkách exprese miR-1 chybí. Pro buněčnou linii FaDu jsem jako optimální látkové množství mimikující miRNA určila 5 pmol a pro buněčnou linii CRL-3240 15 pmol mimikující miRNA.



Obr. 22 Výsledné logaritmické křivky qPCR pro 5 pmol, 15 pmol, 30 pmol a 60 pmol miR-1 a netransfekované buňky v triplikátech. Graf nahore – buněčná linie FaDu, graf dole – buněčná linie CRL-3240, NB – netransfekované buňky, * – optimální látkové množství. Vizualizováno v software Corbett Rotor-Gene 6000 v.1.7.

Standardní křivkou o pěti bodech jsem určila pro referenční RNA RNU48, a také pro transfekované mimikující miRNA miR-1, miR-9-5p a miR-139-5p v buněčné linii, ve které jsem je transfekovala (Tab. 20) (Kap. 5.12). U amplifikační reakce pro miR-9-5p se mi ani po opakování nepodařilo dosáhnout optimální efektivity, proto jsem použila korekci účinnosti amplifikace.

Tab. 20 Přehled hodnot prahu detekce a efektivit amplifikačních reakcí stanovených pomocí standardních křivek pro jednotlivé TaqMan MicroRNA sondy.

TaqMan sonda	Buněčná linie	Hodnota prahu detekce	Efektivita
miR-1	FaDu	0,04328	0,94
miR-1	CRL-3240	0,02040	1,07
miR-139-5p	CRL-3240	0,04758	1,05
miR-9-5p	FaDu	0,04041	1,20
RNU48	FaDu	0,03281	1,06

Dále jsem určila ke každému vzorku v triplikátu Ct hodnoty přiřazením hodnot prahu detekce k příslušné výsledné křivce (Tab. 21). Chybějící Ct hodnoty v triplikátu příslušného vzorku jsem nahradila průměrem detekovaných Ct hodnot daného vzorku,

v případě, že nebyla detekovaná žádná hodnota triplikátu, nahradila jsem Ct hodnotu číslem 40, tedy maximálním počtem cyklů (Goni *et al.*, 2009).

Ct hodnoty jsem importovala do programu GenEx a s analýzou pokračovala stejným způsobem jako u ověření exprese miRNA v buněčných liniích (Kap. 6.6). Jako kalibrátor jsem použila netransfekované buňky příslušné buněčné linie a určila hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) (Tab.22).

Tab. 21 Přehled Ct hodnot použitých pro analýzu miRNA v tranfekovaných liniích CRL-3240 (C) a FaDu (F). Vzorky jsou analyzovány v triplikátech s použitím $9 \times$ ředění cDNA z příslušných buněk. * značí biologické duplikáty. C1 – buňky transfekované miR-1 pozitivní kontrolou, C139 – buňky transfekované miR-139-5p, CK- – buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA, CNB – netransfekované buňky, F1 – buňky transfekované miR-1 pozitivní kontrolou, F9 – buňky transfekované miR-9-5p, FK- – buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA, FNB – netransfekované buňky. Hodnoty značené • nebyly detekovány a jsou doplněny (Goni *et al.*, 2009).

Vzor-ky	miR-1	RNU 48	Vzor-ky	miR-139	RNU 48	Vzor-ky	miR-1	RNU 48	Vzor-ky	miR-9	RNU 48
C1	20,37	24,60	C139	21,75	26,28	F1	31,67	26,92	F9	29,90	27,69
C1	20,28	24,67	C139	21,69	26,32	F1	31,57	27,02	F9	30,02	27,55
C1	20,26	24,81	C139	21,92	26,28	F1	31,62	27,15	F9	29,96•	27,28
CK-	40,00•	26,89	CK-	40,00•	26,89	FK-	40,00•	26,89	FK-	34,78•	26,89
CK-	40,00•	26,91	CK-	40,00•	26,91	FK-	40,00•	26,51	FK-	34,78	26,51
CK-	40,00•	26,85	CK-	40,00•	26,85	FK-	40,00•	26,66	FK-	34,78•	26,66
CNB	40,00•	26,85	CNB	40,00•	26,85	FNB	40,00•	23,90	FNB	32,04	23,90
CNB	40,00•	26,85	CNB	40,00•	26,85	FNB	40,00•	23,82	FNB	31,68	23,82
CNB	40,00•	26,88	CNB	40,00•	26,88	FNB	40,00•	23,91	FNB	31,70	23,91
C1*	20,90	24,24	C139*	19,36	23,74	F1*	25,60	22,16	F9*	22,94	22,34
C1*	20,64	24,28	C139*	19,03	24,11	F1*	25,51	22,33	F9*	22,88	22,51
C1*	20,97	23,98	C139*	19,31	23,86	F1*	25,69	22,39	F9*	22,84	22,66
CK-*	40,00•	24,50	CK-*	33,76•	24,50	FK-*	40,00•	24,18	FK-*	31,59	24,18
CK-*	40,00•	24,28	CK-*	33,76	24,28	FK-*	40,00•	23,77	FK-*	31,80	23,77
CK-*	40,00•	24,58	CK-*	33,76•	24,58	FK-*	40,00•	23,87	FK-*	32,00	23,87
CNB*	40,00•	23,83	CNB*	34,92	23,83	FNB*	40,00•	22,79	FNB*	30,81	22,79
CNB*	40,00•	23,72	CNB*	34,92•	23,72	FNB*	40,00•	22,60	FNB*	30,68	22,60
CNB*	40,00•	23,49	CNB*	34,92•	23,49	FNB*	40,00•	22,61	FNB*	30,75•	22,61

Tab. 22 Přehledová tabulka hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2). * určuje biologické duplikáty. C – CRL-3240, F – FaDu, 1 – transfekováno mimikující miR-1, 139 – transfekováno mimikující miR-139-5p, 9 – transfekováno mimikující miR-9-5p, K- - transfekováno negativní kontrolou mimikující miRNA.

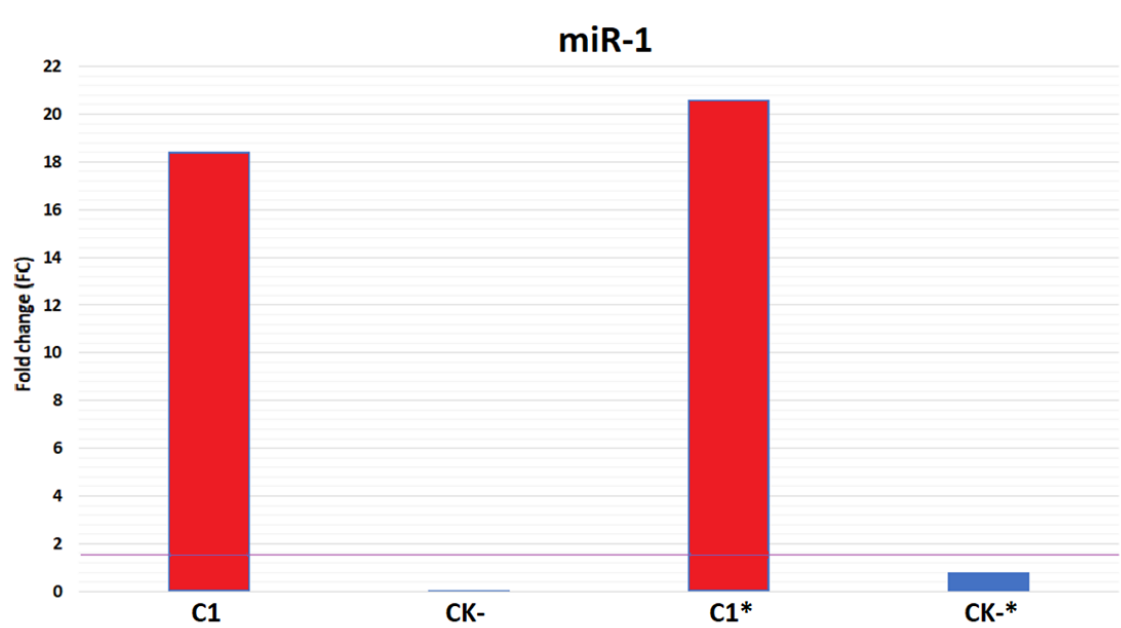
CRL-3240				FaDU			
Vzorky	miR-1	Vzorky	miR-139-5p	Vzorky	miR-1	Vzorky	miR-9-5p
C1	18,42	C139	18,27	F1	11,30	F9	5,89
CK-	0,03	CK-	0,02	FK-	2,93	FK-	-0,45
C1*	20,62	C139*	16,48	F1*	13,38	F9*	8,77
CK-*	0,81	CK-*	2,01	FK-*	1,33	FK-*	0,13

Významná detekce miRNA (FC) je stanovena hodnotou $>1,58$. Stejně jako u ověření diferenciální exprese miRNA v buněčných liniích (Kap. 6.6) kladné hodnoty FC $>1,58$ představují zvýšené množství miRNA a záporné hodnoty FC $>1,58$ snížené množství miRNA.

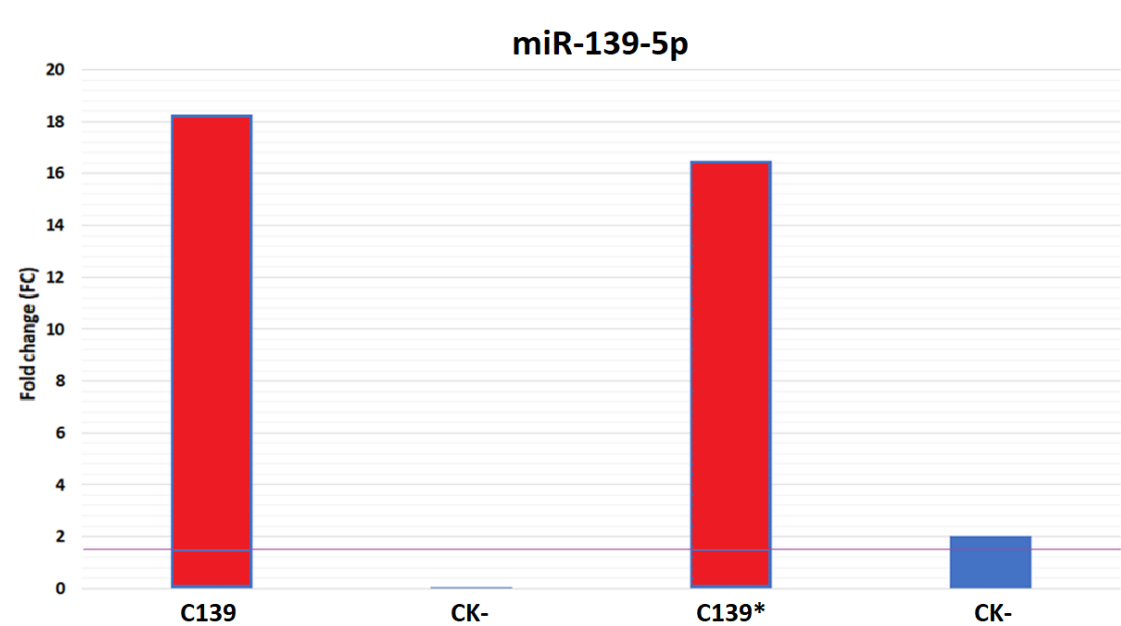
Transfekci vybraných mimikujících miRNA na příslušných buněčných liniích jsem provedla ve dvou nezávislých opakováních (Kap. 5.11). Na obrázku 23 je zobrazena detekce transfekované pozitivní kontroly miR-1 u buněčné linie CRL-3240. Hodnota FC je 18,42 u buněk transfekovaných miR-1 a FC 20,62 u biologického duplikátu. Detekce miR-1, v buňkách transfekovaných negativní kontrolou mimikujících miRNA, nebyla zvýšena, což odpovídá očekávání.

Na obrázku 24 jsou zobrazeny výsledky detekce miR-139-5p po transfekci u buněčné linie CRL-3240, FC zde dosahuje hodnoty 18,27 a 16,48 u biologického duplikátu. U stejné buněčné linie transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA nebyla při první transfekci významně změněna detekce miR-139-5p (FC = 0,02), avšak biologický duplikát měl zvýšenou detekci miR-139-5p (FC = 2,01). Biologický duplikát transfekovaný negativní kontrolou mimikující miRNA měl zvýšenou detekci miR-139-5p, jeho FC však byla 8 x nižší než u buněk transfekovaných miR-139-5p. Přesto by se měl pokus znovu opakovat.

Buňky CRL-3240 se podařilo transfekovat jak mimikující miR-1, která není v buňkách exprimovaná, tak mimikující miR-139-5p, jejíž exprese se je v netransfekovaných buňkách snižena. Detekce miR-139-5p dosahovala při první transfekci 99,5 % hodnoty FC pozitivní kontroly miR-1. V biologickém duplikátu detekce miR-139-5p dosahovala 80,1 % hodnoty FC pozitivní kontroly. Buněčnou linii CRL-3240 se podařilo transfekovat a může sloužit k dalšímu *in vitro* testování.



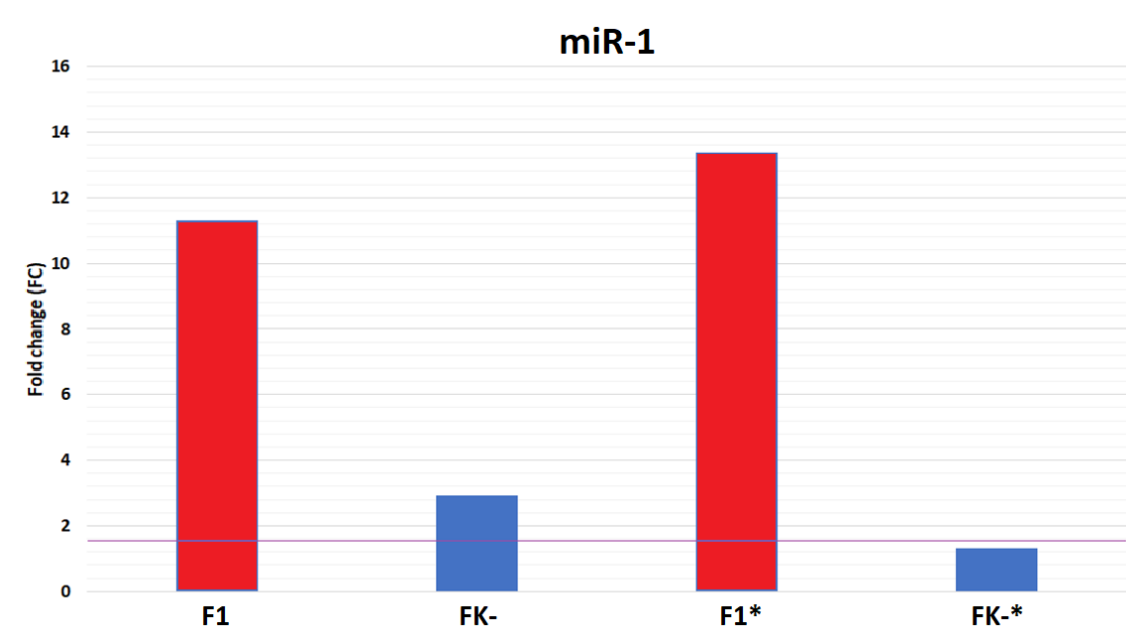
Obr. 23 Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (\log_2) miR-1 v buněčné linii CRL-3240.
 * značený biologický duplikát. Fialová linie určuje \log_2 významnou hodnotu detekce miRNA FC (fold-change) >1,58. C1 – buňky transfekované miR-1, CK- buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA.



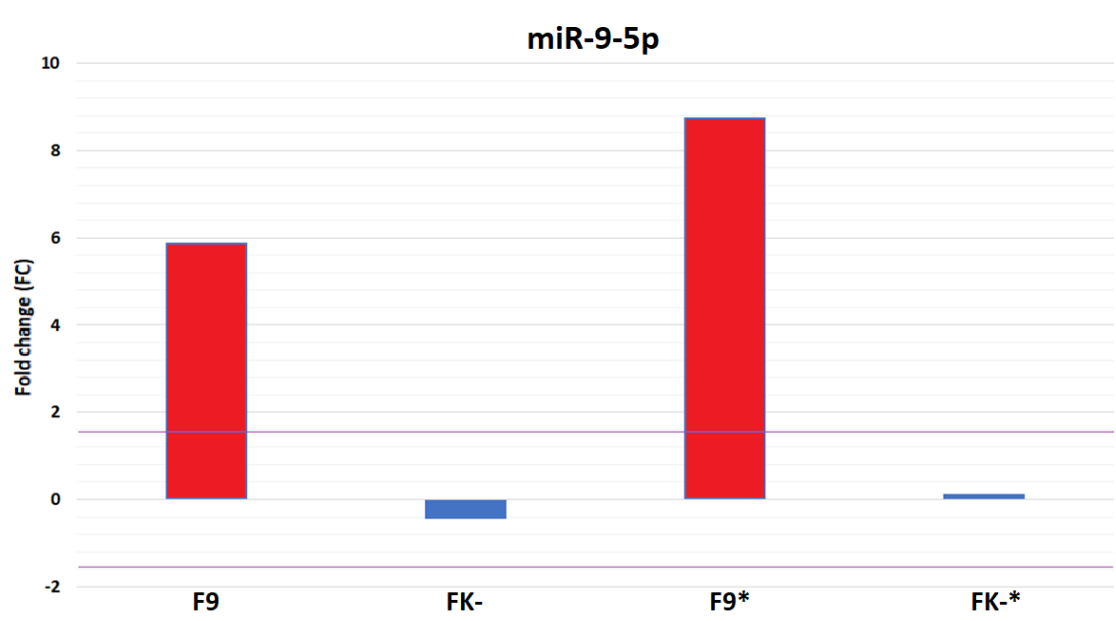
Obr. 24 Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (\log_2) miR-139-5p v buněčné linii CRL-3240.
 * značený biologický duplikát. Fialová linie určuje \log_2 významnou hodnotu detekce miRNA FC (fold-change) >1,58. C139 – buňky transfekované miR-139-5p, CK- buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA.

Detekce miR-1 u buněčné linie FaDu transfekované miR-1 dosahovala hodnot FC 11,3 a 13,38 u biologického duplikátu. I zde však byla zvýšená detekce miR-1 u prvních buněk transfekovaných negativní kontrolou a měla hodnotu FC 2,93 (Obr. 25). Na obrázku 26 je zobrazena detekce miR-9-5p v buňkách FaDu transfekovaných miR-9-5p. Hodnota změny detekce miRNA je 5,89 u prvních transfekovaných buněk FaDu a 8,77 u biologického duplikátu.

Buňky FaDu se podařilo transfekovat jak miR-1, která není v buňkách exprimována, tak miR-9-5p. Detekce miR-9-5p dosahovala při první transfekci 52,2 % hodnoty FC pozitivní kontroly miR-1. Při druhé transfekci detekce miR-9-5p dosahovala 65,7 % hodnoty FC pozitivní kontroly. Buněčnou linii se podařilo transfekovat mimikující miRNA a zvýšit tak její množství v buňkách, což bude sloužit k funkčním testům miRNA.

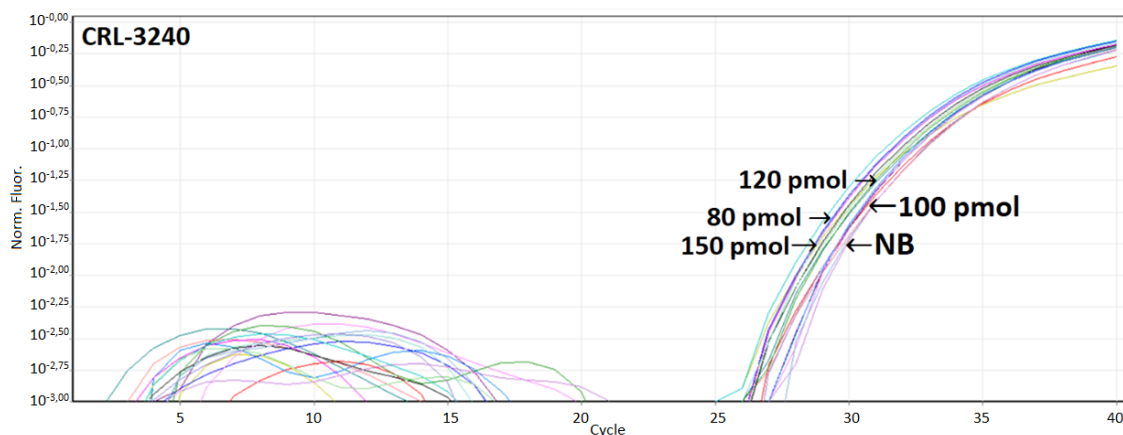


Obr. 25 Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) miR-9-5p v buněčné linii FaDu. * značený biologický duplikát. Fialová linie určuje \log_2 významnou hodnotu detekce miRNA FC (fold-change) $>1,58$. F1 – buňky transfekované miR-1, FK- buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA.



Obr. 26 Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (\log_2) miR-9-5p v buněčné linii FaDu. * značený biologický duplikát. Fialová linie určuje \log_2 významnou hodnotu detekce miRNA FC (fold-change) $>1,58$. F9 – buňky transfekované miR-9-5p, FK- buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA.

Obdobně jako mimikující miRNA jsem optimalizovala transfekci inhibitoru pomocí inhibující miRNA let-7c na buněčné linii CRL-3240. Tato miRNA je doporučena výrobcem jako pozitivní kontrola inhibitoru a je to konzervovaná miRNA napříč živočišnými druhy. Na obrázku 27 je vidět, že i když jsem k optimalizaci použitého množství inhibitoru pro transfekce použila látková množství pozitivní kontroly doporučená výrobcem, k inhibičnímu efektu exprese dané miRNA nedošlo. Výsledné amplifikační křivky byly totožné s expresí let-7c v netransfekovaných buňkách, proto jsem dále s transfekčními pokusy tohoto inhibitoru nepokračovala. Pro další pokusy je třeba použít jiný inhibitor.



Obr. 27 Výsledné logaritmické křivky průběhu qPCR pro 80 pmol, 100 pmol, 120 pmol, 150 pmol let-7c a netransfekované buňky CRL-3240, nanášeno v triplicátech. Vizualizováno v software Corbett Rotor-Gene 6000 v.1.7.

7 Diskuze

MiRNA byla poprvé objevena v roce 1993 u *Caenorhabditis elegans* a jejich následné studium přineslo zcela nový pohled na regulaci genové exprese (Lee *et al.*, 1993). Od té doby byly miRNA identifikovány celkem u 271 organismů včetně virů (www.mirbase.org, říjen 2018). Ukázalo se, že hrají zásadní roli během ontogeneze a jejich exprese se může měnit na základě vývojového stadia jedince. Stejně tak je jejich exprese závislá na zdravotním stavu a téměř u všech lidských nádorů byla pozorována změna v expresi miRNA. Z tohoto důvodu se o nich začalo uvažovat jako o potenciálních diagnostických či terapeutických cílech.

Existenci virových miRNA prokázali Pfeffer a kol. v roce 2004 u γ -herpesviru EBV (virus Epstein-Barrův) (Pfeffer *et al.*, 2004), následně byly objeveny i u dalších nádorových DNA virů jako jsou hepadnaviry, polyomaviry a adenoviry. I když se předpokládalo, že miRNA budou nalezeny i u onkogenních papilomavirů, jejich výskyt nebyl nikdy zcela prokázán. Přesto se ukázalo, že papilomaviry mají značný vliv na buněčné miRNA, jejíž expresi regulují svými proteiny. HPV viry způsobují epiteliální nádory vyskytující se na různých anatomických lokalizacích (zur Hausen, 2009). Při studiu expresních profilů miRNA v těchto nádorech, se potvrdilo, že je důležité karcinomy rozdělovat a analyzovat podle jejich etiologie (O'Sullivan *et al.*, 2016). Expresní profily miRNA nádorů cervixu, nádorů hlavy a krku pozitivních na HPV a negativních na HPV patří mezi nejprostudovanější, na rozdíl od nádorů anu a vulvy, i přesto však u nich není stanovena ani jednotná diagnostická či prognostická miRNA, ani jejich skupina, která by mohla sloužit jako klinicky využitelný panel miRNA.

Ve studii jsem se zaměřila na identifikaci HPV-core miRNA, tedy miRNA, jejichž diferenciální exprese je závislá na přítomnosti papilomaviru typu 16 v nádorové tkáni různé anatomické lokalizace. K detekci těchto miRNA jsem využila vysoce specifickou metodu sekvenování nové generace, které předcházela podrobná charakterizace vzorků.

K analýze byly vybrány FFPE vzorky vulvy, cervixu, anu a tonsil. Tyto vzorky jsou charakteristické vysokou mírou degradace nukleových kyselin na rozdíl od FF tkáně, ale vzhledem k velikosti miRNA (~22 nt) bylo prokázáno, že je možné RNA z FFPE vzorků použít k analýze expresních profilů miRNA. Nicméně je důležité analyzovat vždy pouze jeden typ klinického materiálu (Vojtechova *et al.*, 2017). Výhodou FFPE tkáně je velké množství archivního materiálu z různých anatomických lokalizací, avšak

u některých vzorků nastal problém s izolací RNA a DNA. Tonsilární tkáň, která byla již v předchozích studiích izolována RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kitem, dosahovala optimální koncentrace a čistoty pro sekvenování nové generace, na rozdíl od tkáně vulvy a cervixu izolovaných v této studii stejným způsobem. Tyto vzorky měly při použití RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kitu zvýšený poměr absorbancí A260/280 (>2), který byl pravděpodobně způsobený velmi nízkou koncentrací izolované RNA (Kap. 6.1). Při následném použití kitu TRIzol™ Reagent měla izolovaná RNA snížený poměr absorbancí A260/280 (<1,7), který je důsledkem kontaminace fenolem. Proto bylo nutné metodu izolace optimalizovat a na základě srovnávacích izolací byl nakonec použit AllPrep® DNA/RNA FFPE kit s modifikovaným protokolem, se kterým vzorky dosahovaly koncentrace RNA vhodné pro sekvenování a zároveň optimální čistoty (A260/280 1,8 – 2).

Genotyp HPV jsem určila metodou RLB, kterou je možné identifikovat 37 typů papilomavirů. Samotné hybridizaci předchází PCR reakce se směsí primerů GP5+ a GP6+bio amplifikující variabilní sekvence L1 genu specifické pro různé typy papilomavirů. Výsledky prokázaly výskyt HPV ve 100 % nádorové tkáni cervixu, 84 % nádorové tkáni anu a 41 % nádorové tkáni vulvy, z čehož byl genotyp HPV16 v 83 % nádorů cervixů a ve všech nádorech anu a vulvy pozitivních na HPV. U vzorků jsem následně ověřila přítomnost genu E6 HPV16 pro potvrzení přítomnosti papilomaviru typu 16 v buňce v případě jeho integrace do L1 genu.

Pro charakterizaci vzorků bylo nezbytné prokázat aktivní transkripci virových onkogenů v nádorech pozitivních na HPV16. Pro tento účel jsem použila detekci E6 mRNA. Aktivní transkripci se podařilo prokázat pouze u dvou z osmi vzorků pozitivních na HPV16 určených k sekvenování. Zbýlých šest vzorků bylo falešně negativních, což může být způsobeno vysokou fragmentací RNA. U těchto vzorků jsem využila k prokázání aktivní infekce dvojí pozitivitou, a to HPV DNA a proteinu p16. U karcinomů pozitivních na HPV můžeme pozorovat zvýšenou expresi p16 na rozdíl od nádorů vzniklých bez přítomnosti HPV, kde různými mechanismy dochází ke snížení množství p16 (Takeuchi *et al.*, 2010). Virový protein E7 váže hypofosforylovaný pRb, který slouží jako regulátor buněčného cyklu. Po vazbě s E7 proteinem uvolňuje E2F transkripční faktor, který zpětnovazebnou reakcí transkribuje inhibitor cyklin-dependentní kinázy p16 (Hoffmann *et al.*, 2010). Objevují se však nádory negativní na HPV se zvýšenou expresí proteinu p16, např. některé karcinomy plic, proto je vždy potřeba také potvrdit přítomnost

DNA papilomaviru (Li *et al.*, 2013). Aktivní infekci jsem potvrdila u všech vzorků pozitivních na HPV, které byly vybrány k sekvenování nové generace.

Sekvenování nové generace bylo z logistických a finančních důvodů provedeno na dvou pracovištích. V Chorvatsku byly zpracovány vzorky cervixu, tonsil a vulvy s využitím sekvenátoru NextSeq 550 a v Německu byly sekvenátorem HiSeq 2500 zpracovány vzorky anu a opakovaně část vzorků vulvární tkáně. Největší množství diferenciólně exprimovaných miRNA se ukázalo v nádorech cervixu, které jsou všechny pozitivní na výskyt HPV16, bylo zde identifikováno 283 miRNA. Zajímavé je, že jsem pozorovala významný překryv mezi cervikálními tumory pozitivními na HPV a vulvární nádorovou tkání negativní na HPV.

MiRNA se sníženou expresí, které jsou ve studiích cervikálního karcinomu opakovaně identifikovány (miR-218-5p, miR-125b-5p, miR-99a-5p, miR-143-3p, miR-145-5p) (Pereira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Wilting *et al.*, 2013), se ukázaly být shodně deregulované také u nádorů vulvy negativních na HPV. Jak již bylo zmíněno, exprese tumor-supresorové miR-218-5p je regulována virovým proteinem E7 (Martinez *et al.*, 2008), její deregulace však byla objevena i u dalších nádorů jako jsou nádory ledvin, prostaty či žaludku (Gao *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Guan *et al.*, 2017), což svědčí o alternativní, HPV-nezávislé deregulaci. V cervikálním karcinomu byla její snížená exprese spojena se zvýšenou expresí enzymu IDO1 (indoleamine-2,3-dioxygenase 1), který negativně reguluje imunitní odpověď (Zhu *et al.*, 2018). Cui a kol. ukázali, že miR-125b-5p zvyšuje proliferaci buněk cervikálního karcinomu přes signální dráhu PI3K/Akt/mTOR (Cui *et al.*, 2012). Stejně tak snížená exprese miR-99a-5p byla spojena se zvýšenou proliferací cervikálních buněk zprostředkovanou regulací signální dráhy mTOR (Wang *et al.*, 2014). MiR-143-3p a miR-145-5p jsou transkribovány ze společného klastru. Obě tyto miRNA mají tumor-supresivní charakter a byly spojeny s migrací nádorových buněk cervixu. MiR-143-3p přímo inhibuje membránový protein GOLM1 (Golgi membrane protein 1) (Zhou *et al.*, 2018), dále pak miR-145-5p inhibuje transkripční faktory Sox2, Nanog a Oct4 (Zhou *et al.*, 2017). Tyto dvě miRNA jsou často detekovány v nádorech hlavy a krku, kde slouží jako prognostický znak (Lajer *et al.*, 2011; Bufalino *et al.*, 2015; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). V této studii však diferenciólní exprese miR-143-3p a miR-145-5p v tonsilárních nádorech prokázána nebyla. Vzhledem k nedostatku studií exprese miRNA ve vulvárních nádorech, není možné v těchto tkáních dostatečně porovnat diferenciólní expresi miRNA. Maia a kol. identifikovali zvýšenou expresi rodiny miR-17 v nádorových buňkách vulvy

negativních na HPV (Maia *et al.*, 2015). Do této rodiny patří miR-17-5p a miR-106b-5p, které jsem v sekvenační analýze identifikovala jako miRNA se sníženou expresí v nádorech cervixu a v nádorech vulvy negativních na HPV. Jak bylo ukázáno, snížená exprese miR-106b-5p byla spojena se zvýšením exprese vimentinu a snížením E-catherinu, což významně ovlivňuje epiteliálně-mezenchymální tranzici (Piao *et al.*, 2017; Yi *et al.*, 2018). V dalších studiích však tyto dvě miRNA měly v cervikálních karcinomech zvýšenou expresi (Wei *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2018). Tyto diferencióálně exprimované miRNA jsou potenciálními prognostickými znaky a další výzkum by se mohl zaměřit na jejich hlubší analýzu.

Ve vulvárních nádorech pozitivních na HPV byla identifikována pouze jedna signifikantní deregulovaná miRNA, a to miR-451a. Tato miRNA však byla deregulována také ve všech nádorech tonsil, v nádorech cervixu a ve vulvárních karcinomech negativních na HPV. Její snížená exprese byla popsána v nádorech hlavy a krku, nádorech ledvin a žaludku (Su *et al.*, 2015; Riquelme *et al.*, 2016). Jedná se o tumor-supresorovou miRNA, jejíž zvýšená exprese v nádorech hlavy a krku predikuje horší prognózu a objevuje se u pacientů s rekurentním onemocněním (Hui *et al.*, 2010).

HPV-core miRNA ze všech nádorů pozitivních na HPV nebylo možné určit z důvodu nepřítomnosti diferencióálně exprimovaných miRNA ve vulvárních karcinomech pozitivních na HPV. Deregulované miRNA, vyskytující se shodně pouze v HPV pozitivních nádorech cervixu, tonsil a anu, jsem identifikovala tři, a to miR-139-5p se sníženou expresí a miR-4508 a miR-663a se zvýšenou expresí. Lajer a kol. studovali překryv miRNA mezi nádory cervixu a nádory hlavy a krku. Podařilo se jim určit 14 HPV-core miRNA, z nichž jedna byla právě mnou detekovaná miR-139-5p, která měla v jejich studii také sníženou expresi. Jako potenciální cíl této miRNA autoři určili ubikvitin ligázu E6AP (E6 associated protein), která spolu s HPV proteinem E6 degraduje tumor-supresorový transkripční faktor p53 (Lajer *et al.*, 2012). MiRNA-139-5p byla také označena jako deregulovaná tumor-supresorová miRNA u nádorů dlaždicových buněk jazyka, nebyla však zkoumána ve spojitosti s HPV (Wong *et al.*, 2008). MiR-4508 patří mezi méně prozkoumané miRNA. Její diferencióální exprese byla nalezena v krvi pacientů s chronickou hepatitidou B, kde slouží jako prognostický znak rozvoje cirhózy či karcinomu jater (Riazalhosseini *et al.*, 2017). Diferencióální exprese miR-663a byla objevena v několika různých karcinomech jako je hepatocelulární karcinom či glioblastom, kde ovlivňuje proliferaci buněk a je považována za tumor-supresivní miRNA (Shi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018). Mezi HPV

asociovanými miRNA nebyla identifikována miR-9-5p, která je v několika studiích publikována jako miRNA aberantně exprimovaná v karcinomech pozitivních na HPV (Hui *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019).

Vzhledem k překryvu expresního profilu jedné miRNA mezi mou studií a publikací Lajera a kol., jsem k dalším pokusům *in vitro* vybrala miR-139-5p (Lajer *et al.*, 2012). Mezi mou studií a výzkumem Vojtěchové a kol., kteří se také zabývali identifikací HPV-core miRNA, nebyl nalezen žádný překryv, který by umožnil vybrat miRNA k *in vitro* testům (Vojtechova *et al.*, 2016).

Před transfekčními pokusy jsem na buněčných liniích pozitivních a negativních na HPV, otestovala expresi miRNA pomocí RT-qPCR. Zjišťovala jsem expresi miR-9-5p, která je v několika studiích označena jako miRNA specifická pro nádory pozitivní na HPV (Hui *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013; Vojtechova *et al.*, 2016; Božinović *et al.*, 2019). Dále jsem podle studie Lajer a kol. vybrala miR-199a-3p, která by měla mít sníženou expresi v nádorech pozitivních na HPV, a miR-20b, která by naopak měla mít zvýšenou expresi v nádorech pozitivních na HPV. Obě tyto miRNA byly označeny jako HPV-core ve studii Lajer a kol. (Lajer *et al.*, 2012). Dále jsem použila sondu miR-21*. Deregulace miR-21* byla označena jako prognostický znak u nádorů cervixu a její exprese by v těchto buňkách měla být zvýšena (Han *et al.*, 2015). Pokusila jsem se také otestovat miR-139-5p, ale vzhledem její velmi nízké expresi se mi nepodařilo určit standardní křivku.

Předpoklad, že exprese těchto miRNA bude významně deregulována vždy pouze u buněk pozitivních na HPV, se potvrdil pouze u miR-9-5p, kde byla zvýšena exprese této miRNA jak v cervikální buněčné linii SiHa, tak v hypofaryngeální buněčné linii CRL-3240. MiR-20b a miR-21* byly významně exprimovány v buněčné linii CRL-3240, ale neobjevily se v buněčné linii SiHa. Pro definitivní potvrzení výsledků je však třeba tento pokud ještě opakovat.

Transfekci miRNA jsem provedla na primárních hypofaryngeálních buněčných liniích CRL-3240 (pozitivní na HPV) a na buněčné linii FaDu (negativní na HPV). Buňky jsem úspěšně transfekovala mimikující miR-9-5p a miR-139-5p. Po transfekci miR-139-5p již bylo možné detekovat tuto miRNA pomocí RT-qPCR, stejně tak tomu bylo u miR-9-5p. Tyto buňky následně budou použity k funkčním testům a ověření exprese cílových genů příslušných miRNA.

V následujících analýzách může být ověřen gen CAAP1 (C9orf82, caspase activity and apoptosis inhibitor), který je cílem miR-139-5p s cílovým skóre 96 (www.mirdb.org).

Cílové skóre se pohybuje v rozmezí 50 – 100, a pokud je vyšší než 80, je vysoká pravděpodobnost správného určení cíle. Vysoká koncentrace proteinu CAAP1 inhibuje apoptózu regulací kaspázy 10 (Ferguson *et al.*, 2011). Jeden z potenciálních cílů miR-9-5p je mRNA MAP3K2 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2) s cílovým skóre 96 (www.mirdb.org). Tento protein je součástí MAP kinázové signální dráhy a jeho inhibice snižuje proliferaci a migraci buněk (Cheng *et al.*, 2000).

8 Souhrn

V této práci jsem zpracovala FFPE vzorky nádorů vulvy, cervixu a anu. Optimalizovala jsem izolaci nukleových kyselin a zkontrolovala jejich kvalitu. Určila jsem genotyp papilomavirů v tkáni a následně ověřila přítomnost aktivní infekce HPV. Na základě těchto dat jsem vybrala soubor vzorků k sekvenování nové generace. Soubor byl obohacený o tonsilární tkáň charakterizovanou v předchozích studiích. Výsledná data ze sekvenování jsem zpracovala v programu Geneious a identifikovala diferencially exprimované miRNA, vytvořila překryvy expresních profilů mezi HPV asociovanými nádory a vybrala potenciální HPV-core miRNA. Tyto miRNA jsem detekovala po transfekci mimikující/inhibující miRNA v selektovaných buněčných liniích, představujících model tkáně různé lokalizace a s různou etiologií nádoru.

9 Seznam použité literatury

- Applied Biosystems (2006). "Amplification Efficiency of TaqMan Gene Expression Assays." *Applied Biosystems Application Note*: 2–7.
- Au Yeung, C. L., Tsang, T. Y., Yau, P. L., Kwok, T. T. (2011). "Human Papillomavirus Type 16 E6 Induces Cervical Cancer Cell Migration through the P53 / MicroRNA-23b/Urokinase-Type Plasminogen Activator Pathway." *Oncogene* 30(21): 2401–2410.
- *Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions." *Cell* 136(2): 215–233.
- Beers, E. H. Van, Joosse, S. A., Ligtenberg, M. J., Fles, R., Hogervorst, F. B. L., Verhoef, S., Nederlof, P. M. (2006). "A Multiplex PCR Predictor for ACGH Success of FFPE Samples." *British Journal of Cancer*: 94(2): 333–37.
- Bernard, M. A., Zhao, H., Yue, S. C., Anandaiah, A., Koziel, H., Tachado, S. D. (2014). "Novel HIV-1 MiRNAs Stimulate TNF a Release in Human Macrophages via TLR8 Signaling Pathway." *PLoS One* 9(9).
- Blenkiron, Ch., Goldstein, L. D., Thorne, N. P., Spiteri, I., Chin, S. F., Dunning, M. J., Barbosa-Morais, N. L., Teschendorff, A. E., Green, A. R., Ellis, I. O., Tavaré, S., Caldas, C., Miska, E. (2007). "MicroRNA Expression Profiling of Human Breast Cancer Identifies New Markers of Tumor Subtype." *Genome Biology*. 8(10): R214.
- Bonin, S., Petrer, F., Niccolini, B., Stanta, G. (2003). "PCR Analysis in Archival Postmortem Tissues." *Molecular Pathology* 56(3): 184–186.
- Borchert, G. M., Lanier, W., Davidson B. L. (2006). "RNA Polymerase III Transcribes Human MicroRNAs." *Nature Structural & Molecular Biology* 13(12): 1097–1101.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinzl, A., Scheurlen, W., zur Hausen, H. (1984). "A New Type of Papillomavirus DNA, Its Presence in Genital Cancer Biopsies and in Cell Lines Derived from Cervical Cancer." *The EMBO Journal* 3(5): 1151–57.
- Božinović, K., Sabol, I., Dediol, E., Gašperov, N. M., Manojlović, S., Vojtechova, Z., Tachezy, R., Grce, M. (2019). "Genome-Wide MiRNA Profiling Reinforces the Importance of MiR-9 in Human Papillomavirus Associated Oral and Oropharyngeal Head and Neck Cancer." *Scientific Reports* 9(1): 2306.
- Brule, A. J. C. Van D., Pol, R. Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. L. M., Snijders, P. J. F. (2002). "GP5+ / 6+ PCR Followed by Reverse Line Blot Analysis Enables Rapid and High-Throughput Identification of Human Papillomavirus Genotypes." *Journal of Clinical Microbiology* 40(3): 779–87.
- Bufalino, A., Cervigne, N. K., Oliveira, C. E. D., Fonseca, F. P., Rodrigues, P. C., Carneiro, C., Macedo, S., Sobral, L. M., Lambert, W., Salo, T. A., Kowalski, L. P., Graner, E., Coletta, R. D. (2015). "Low MiR-143 / MiR-145 Cluster Levels Induce Activin A Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas , Which Contributes to Poor Prognosis." *PLoS One*: 10(8): e0136599.
- Bzhalava, D., Eklund C., Dillner J. (2015). "International Standardization and Classification of Human Papillomavirus Types." *Virology* 476: 341–344.
- Cai, N., Hu, L., Xie, Y., Gao, J., Zhai, W., Wang, L., Jin, Q., Qin, C., Qiang, R. (2018). "MiR-17-5p Promotes Cervical Cancer Cell Proliferation and Metastasis by Targeting Transforming Growth Factor- β Receptor 2." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 22(7): 1899–1906.

- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C. M. (2002). "Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro- RNA Genes MiR15 and MiR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia." *PNAS* 99(24): 13–18.
- Clifford G. M., S., Gallus S., Herrero R., Muñoz N., Snijders P. J., Vaccarella S., Anh P. T., Ferreccio C., Hieu N. T., Matos E., Molano M., Rajkumar R., Ronco G., de Sanjosé S., Shin H.R., Sukvirach S., Thomas J. O., Tunsakul S., Meijer C. J., Franceschi S. (2005). "Worldwide Distribution of Human Papillomavirus Types in Cytologically Normal Women in the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys : A Pooled." *Lancet Oncology* 366(9490): 991–998.
- Cui, F., Li, X., Zhu, X., Huang, L., Huang, Y., Mao, C. 2012. "MiR-125b Inhibits Tumor Growth and Promotes Apoptosis of Cervical Cancer Cells by Targeting Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit Delta." *Cellular Physiology and Biochemistry* 30(5): 1310–18.
- de Martel, C., Plummer, M., Vignat, J., Franceschi, S. (2017). "Worldwide Burden of Cancer Attributable to HPV by Site , Country and HPV Type." *International Journal of Cancer* 33(0): 664–70.
- Dittmer, A., Katalinic, C., Mundhenke, C., Thill, M., Fischer, D. (2011). "Epidemiology of Vulvar and Vaginal Cancer in Germany." *Archives of Gynecology and Obstetrics* 284(1): 169–174.
- Fakhry, C., Zhang, Q., Nguyen-Tan, P. F., Rosenthal, D., El-naggar, A., Garden, A. S., Soulieres, D., Trotti, A., Avizonis, V., Ridge, J. A., Harris, J., Le, Q. T. (2019). "Human Papillomavirus and Overall Survival After Progression of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." *Journal of Clinical Oncology* 32(30): 3365-3373.
- Ferguson, D. J., Zhang, Y., Johansson, E., Miller, M. L., Ja, R. U., Meller, J., Anderson, M. W. (2011). "Identification of a Conserved Anti-Apoptotic Protein That Modulates the Mitochondrial Apoptosis Pathway." *PLoS One* 6(9): e25284.
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2009). "Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs." *Genome Research* 19(1): 92–105.
- Gao, C., Zhang, Z., Liu, W., Xiao S., Gu, W., Lu, H. (2010). "Reduced MicroRNA-218 Expression Is Associated With High Nuclear Factor Kappa B Activation in Gastric Cancer." *Cancer* 116(1): 41–49.
- Gao, G., Gay H. A., Chernock, R. D., Zhang, T. R., Luo, J., Thorstad, W. L., Lewis, J. S. Jr, Wang, X. (2013). "A MicroRNA Expression Signature for the Prognosis of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." *Cancer* 119(1): 72-80.
- Gao, G., Wang, J., Kasperbauer, J. L., Tombers, N. M., Teng, F., Gou, H., Zhao, Y., Bao, Z., Smith, D. I. (2019). "Whole Genome Sequencing Reveals Complexity in Both HPV Sequences Present and HPV Integrations in HPV-Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas." *BMC Cancer*: 19(1): 352.
- Gebeshuber, C. A., Zatloukal K., Martinez J. 2009. "MiR-29a Suppresses Tristetraprolin, Which Is a Regulator of Epithelial Polarity and Metastasis." *EMBO Reports* 10(4): 400–405.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., Sapp, M. 2001. "Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate." *Journal of Virology* 75(3): 1565–70.
- Gocze, K., Gombos, K., Kovacs, K., Juhasz, K., Gocze, P., Kiss, I. (2015). "MicroRNA Expressions in HPV-Induced Cervical Dysplasia and Cancer." *Anticancer Research* 35(1): 523–530.
- Goni, R., García, P., Foissac, S. (2009). "The qPCR Data Statistical Analysis."

Integronics White Paper: 1–9.

- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631–640.
- Guan, B., Wu, K., Zeng, J., Xu, S., Mu, L., Gao, Y., Wang, K., Ma, Z., Tian, J., Shi, Q., Guo, P., Wang, X., He, D., Du, Y. (2017). “Tumor-Suppressive MicroRNA-218 Inhibits Tumor Angiogenesis via Targeting the mTOR Component RICTOR in Prostate Cancer.” *Oncotarget* 8(5): 8162-8172.
- Han, Y., Xu, G. X., Lu, H., Yu, D. H., Ren, Y., Wang, L., Huang, X. H., Hou, W. J. (2015). “Dysregulation of MiRNA-21 and Their Potential as Biomarkers for the Diagnosis of Cervical Cancer.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(6): 7131–39.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Kim, Y. K., Jin, H., Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development*, 18(24), 3016–3027.
- Hoffmann, M., Ihloff, A. S., Go, T., Weise, J. B., Fazel, A., Krams, M., Rittgen, W., Schwarz, E., Kahn, T. (2010). “P16(INK4a) Overexpression Predicts Translational Active Human Papillomavirus Infection in Tonsillar Cancer.” *International Journal of Cancer* 127(7): 1595-1602.
- *Hu, Z., Zhu, D., Wang, W., Li, W., Jia, W., Zeng, X., Ding, W., Yu, L., Wang, X., Wang, L., Shen, H., Zhang, C., Liu, H., Liu, X., Zhao, Y., Fang, X., Li, S., Chen, W., Tang, T., Fu, A., Wang, Z., Chen, G., Gao, Q., Li, S., Xi, L., Wang, Ch., Liao, S., Ma, X., Wu, P., Li, K., Wang, S., Zhou, J., Wang, J., Xu, X., Wang, H., Ma, D. (2015). “Genome-Wide Profiling of HPV Integration in Cervical Cancer Identifies Clustered Genomic Hot Spots and a Potential Microhomology-Mediated Integration Mechanism.” *Nature Genetics* 47(2): 12–19.
- Hui, A. B. Y., Lenarduzzi, M., Krushel, T., Waldron, L., Pintilie, M., Shi, W., Perez-Ordonez, B., Jurisica, I., O’Sullivan, B., Waldron, J., (2010). “Comprehensive MicroRNA Profiling for Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.” *Clinical Cancer Research* (14): 1129–40.
- Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C. V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J. T., (2009). “Widespread MicroRNA Repression by Myc Contributes to Tumorigenesis.” *Nature genetics* 40(1): 43–50.
- Chendrimada, T. P., Finn, K. J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R. I., Liebhaber, S., Pasquinelli, A. E., Shiekhattar, R. (2007). “MicroRNA Silencing through RISC Recruitment of EIF6.” *Nature* 447(7146): 823–28.
- Cheng, J., Yang, J., Xia, Y., Karin, M., Su, B. (2000). “Synergistic Interaction of MEK Kinase 2, c-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Kinase 2, and JNK1 Results in Efficient and Specific JNK1 Activation.” *Molecular and cellular biology* 20(7): 2334–42.
- Cheung, T. H., Man, K. N. M., Yu, M. Y., Yim, S. F., Siu, N. S. S., Lo, K. W. K., Doran, G., Wong, R. R. Y., Wang, V. W., Smith, D. I., Worley, M. J., Berkowitz, R. S., Chung, T. K. H., Wong, Y. F. (2012). “Dysregulated MicroRNAs in the Pathogenesis and Progression of Cervical Neoplasm.” *Cell Cycle* 11(15): 4101.
- Chin L. J., Ratner E., Leng S., Zhai R., Nallur S., Babar I., Muller R. U., Straka E., Su L., Burki E. A., Crowell R. E., Patel R., Kulkarni T., Homer R., Zelterman D., Kidd K. K., Zhu Y., Christiani D. C., Belinsky S. A., Slack F. J., Weidhaas J. B. 2009. “A SNP in a Let-7 MicroRNA Complementary Site in the KRAS 3’UTR Increases Non-Small Cell Lung Cancer Risk.” *Cancer Research* 68(20): 8535–8540.
- Liu, F. F. (2013). “Potentially Prognostic MiRNAs in HPV-Associated Oropharyngeal Carcinoma.” *Clinical Cancer Research* 19(5): 2154–63.

- Jeon, S., Allen-Hoffmann B. L., Lambert, P. F. (1995). "Integration of Human Papillomavirus Type 16 into the Human Genome Correlates with a Selective Growth Advantage of Cells." *Journal of Virology* 69(5): 2989–97.
- Judson, P. L., Habermann E. B., Baxter, N. N., Durham, S. B., Virning, B. A. (2006). "Trends in the Incidence of Invasive and in Situ Vulvar Carcinoma." *Obstetrics and Gynecology* 107(5): 1018–22.
- *Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., Sakai, H. (2012). "Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses That Depends upon Squamous Epithelial Differentiation." *Frontiers in Microbiology* 3: 152
- Ke, G., Liang, L., Yang, J. M., Huang, X., Han, D., Huang, S., Zhao, Y., Zha, R., He, X., Wu, X. (2013). "MiR-181a Confers Resistance of Cervical Cancer to Radiation Therapy through Targeting the pro-Apoptotic PRKCD Gene." *ONCOGENE* 32(25): 3019–3027.
- Kim, Y. T., Thomas, N. F., Kesis, T. D., Wilkinson, E. J., Hedrick, L., Cho, K. R. (1996). "P53 Mutations and Clonality in Vulvar Carcinomas and Squamous Hyperplasias: Evidence Suggesting That Squamous Hyperplasias Do Not Serve as Direct Precursors of Human Papillomavirus-Negative Vulvar Carcinomas." *Human Pathology* 27(4): 389–95.
- Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T., Day, P. M. (2009). "The Initial Steps Leading to Papillomavirus Infection Occur on the Basement Membrane Prior to Cell Surface Binding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(48): 20458-20463.
- Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., Rotnaglova, E., Ludvikova, V., Tachezy, R. (2013). "Markers of HPV Infection and Survival in Patients with Head and Neck Tumors." *International Journal of Cancer* 133(8) 1832–1839.
- Lajer, C. B., Nielsen, F. C., Norrild, B., Borup, R., Garnæs, E., Rossing, M., Specht, L. (2011). "Different MiRNA Signatures of Oral and Pharyngeal Squamous Cell Carcinomas : A Prospective Translational Study." *British Journal of Cancer* 104(5): 830–840.
- Lajer, C. B., Garnæs, E., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Therkildsen, M. H., Glud, M., Rossing, M., Lajer, H., Svane, D., Skotte, L., Specht, L., Buchwald, C., Nielsen, F. C., Garnæs, E., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Therkildsen, M. H., Glud, M., Rossing, M., Lajer, H., Svane, D., Skotte, L., Specht, L., Buchwald, C., Nielsen, F. C., Garnæs, E., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Therkildsen, M. H., Glud, M., Rossing, M., Lajer, H., Svane, D., Skotte, L., Specht, L., Buchwald, C., Nielsen, F. C. (2012). "The Role of MiRNAs in Human Papilloma Virus (HPV)-Associated Cancers: Bridging between HPV-Related Head and Neck Cancer and Cervical Cancer." *British Journal of Cancer* 106(9): 1526–34.
- Lee, R. C., Feinbaum R. L., Ambros, V. (1993). "The C . Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & Lin-14." *Cell* 75: 843–54.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. (2004). "MicroRNA Genes Are Transcribed by RNA Polymerase II." *The EMBO Journal* 23(20): 4051-4060
- Li, J. G., Li, L., Zhang, S. W. (2013). "Different Expression of P16INK4a and P14ARF in Cervical and Lung Cancers." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17(22): 3007–3011.
- Li, X. R., Chu, H. J., Lv, T., Wang, L., Kong, S. F., Dai, S. Z. (2014). "MiR-342-3p Suppresses Proliferation , Migration and Invasion by Targeting FOXM1 in Human Cervical Cancer." *FEBS Letters* 588(17): 3298–3307.

- Li, Y., Liu, J., Yuan, C., Cui, B., Zou, X., Qiao, Y. (2010). "High-Risk Human Papillomavirus Reduces the Expression of MicroRNA-218 in Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia." *The Journal of International Medical Research* 38(5): 1730–1736.
- Li, Y., Wang, F., Xu, J., Ye, F., Shen, Y., Zhou, J., Lu, W., Wan, X., Ma, D., Xie, X. (2011). "Progressive MiRNA Expression Profiles in Cervical Carcinogenesis and Identification of HPV-Related Target Genes for MiR-29." *The Journal of Pathology* 224(4): 484–495.
- Lim, Y. Y., Wright, J. A., Attama, J. L., Gregory, P. A., Bert, A. G., Smith, E., Thomas, D., Lopez, A. F., Drew, P. A., Khew-Goodall, Y., Goodall, G. J. (2009). "Epigenetic Modulation of the MiR-200 Family Is Associated with Transition to a Breast Cancer Stem-Cell- like State." *Journal of Cell Science* 126(Pt 10): 2256–66.
- Liu, C., Lin, J., Li, L., Zhang, Y., Chen, W., Cao, Z., Zuo, H., Chen, C., Kee, K. (2015). "HPV16 Early Gene E5 Specifically Reduces MiRNA-196a in Cervical Cancer Cells." *Scientific Reports* 5:7653.
- Liu, J., Sun, H., Wang, X., Yu, Q., Li, S., Yu, X., Gong, W. (2014). "Increased Exosomal MicroRNA-21 and MicroRNA-146a Levels in the Cervicovaginal Lavage Specimens of Patients with Cervical Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 15(1): 758–773.
- Liu, W., Gao, G., Hu, X., Wang, Y., Schwarz, J. K., Chen, J. J., Grigsby, P. W., Wang, X. (2014). "Activation of MiR-9 by Human Papillomavirus in Cervical Cancer." *Oncotarget* 5(22): 11620–30.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15(12): 550.
- Maia, B. D., Rocha, L., Sant, L., Rodrigues, A., Coutinho-Camillo, C. M., Baiocchi, G., Stiepcich, M. M. (2013). "MicroRNA Portraits in Human Vulvar Carcinoma." *Cancer Prevention Research* 6(11): 1231–1241.
- Maia, B. M., Ling, H., Monroig, P., Ciccone, M., Soares, F. A., Calin, G. A., Rocha, R. M. (2015). "Design of a MiRNA Sponge for the MiR-17 MiRNA Family as a Therapeutic Strategy against Vulvar Carcinoma." *Molecular and Cellular Probes* 29(6): 420–26.
- Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Deng, G. R., Chang, I., Greene, K., Tanaka, Y., Dahiya, R., Yamamura, S. (2013). "MicroRNA-23b Functions as a Tumor Suppressor by Regulating Zeb1 in Bladder Cancer." *PLoS One* 8(7): e67686.
- Martinez, I., Gardiner, A. S., Board, K. F., Monzon, F. A., Edwards, R. P., Khan, S. A. (2008). "Human Papillomavirus Type 16 Reduces the Expression of MicroRNA-218 in Cervical Carcinoma Cells." *Oncogene* 27(18): 2575–2582.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., Sonenberg, N. (2007). "MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex EIF4F." *Science (New York, N.Y.)* 317(5845): 1764–67.
- Melbye, M., Sprogel, P. 1991. "Aetiological Parallel between Anal Cancer and Cervical Cancer." *Lancet oncology* 338(8768): 657-659.
- Mirghani, H., Ugolin, N., Ory, C., Goislard, M., Lefevre, M., Baulande, S., Hofman, P., Guily, J. L., Chevillard, S., Lacave, R. (2016). "Comparative Analysis of MicroRNAs in Human Papillomavirus – Positive versus – Negative Oropharyngeal Cancers." *Head & Neck* 38(11): 1634-1642.
- Monsjou, van H. S., Wreesmann, V. B., Van Den Brekel, M. W. M., Balm, A. J. M. (2013). "Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Young Patients." *Oral*

- Oncology* 49(12): 1097–1102.
- Marušič, M. B., Ozbun, M. A., Campos, S. K., Myers, M. P., Banks, L. (2012). “Human Papillomavirus L2 Facilitates Viral Escape from Late Endosomes via Sorting Nexin 17.” *Traffic* 13(3): 455–467.
- Myklebust, M. P., Bruland, O., Fluge, Ø., Skarstein, A., Balteskard, L., Dahl, O. (2011). “MicroRNA-15b Is Induced with E2F-Controlled Genes in HPV-Related Cancer.” *British Journal of Cancer* 105(11): 1719–1825.
- Olthof, N. C., Huebbers, C. U., Kolligs, J., Henfling, M., Ramaekers, F. C., Cornet, I., van Lent-Albrechts, J. A., Stegmann, A. P., Silling, S., Wieland, U., Carey, T. E., Walline, H. M., Gollin, S. M., Hoffmann, T. K., de Winter, J., Kremer, B., Klussmann, J. P., Speel, E. J. (2015). “Viral Load, Gene Expression and Mapping of Viral Integration Sites in HPV16-Associated HNSCC Cell Lines.” *International Journal of Cancer* 136(5): E207-18.
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C., Lund, A. H. (2008). “MicroRNA-10a Binds the 5’UTR of Ribosomal Protein MRNAs and Enhances Their Translation.” *Molecular Cell* 30(4): 460–71.
- O’Sullivan, B., Huang, S. H., Su, J., Garden, A. S., Sturgis, E. M., Dahlstrom, K., Lee, N., Riaz, N., Pei, X. (2016). “Development and Validation of a Staging System for HPV-Related Oropharyngeal Cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging (ICON-S): A Multicentre Cohort Study.” *Lancet Oncology* 17(4): 440–451.
- *Pardini, B., De Maria, D., Francavilla, A., Di Gaetano, C., Rongo, G., Naccarati, A. (2018). “MicroRNAs as Markers of Progression in Cervical Cancer : A Systematic Review.” *BMC cancer* 18(1): 696.
- Parfenov, M., Pedomallu, C. S., Gehlenborg, N., Freeman, S.S., Danilova, L., Bristow, C. A., Lee, S., Hadjipanayis, A. G., Ivanova, E. V., Wilkerson, M. D., Protopopov, A., Yang, L., Seth, S., Song, X., Tang, J., Ren, X., Zhang, J., Pantazi, A., Santoso, N., Xu, A. W., Mahadeshwar, H., Wheeler, D. A., Haddad, R. I., Jung, J., Ojesina, A. I., Issaeva, N., Yarbrough, W. G., Hayes, D. N., Grandis, J. R., El-Naggar, A. K., Meyerson, M., Park, P. J., Chin, L., Seidman, J. G., Hammerman, P. S., Kucherlapati, R. (2014). “Characterization of HPV and Host Genome Interactions in Primary Head and Neck Cancers.” *PNAS* 111(43): 15544-15549.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2002). “Global Cancer Statistics , 2002.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55(2): 74-108.
- Pereira, P. M., Marques, J. P., Soares, A. R., Carreto, L., Santos, M. A. (2010). “MicroRNA Expression Variability in Human Cervical Tissues.” *PLoS One* 5(7): e11780.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J., Sharp, P. A. (2006). “Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells.” *Molecular Cell* 21(4): 533–542.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., Tuschl, T. 2004. “Identification of Virus-Encoded MicroRNAs.” *Science* 304(5671): 734–736.
- Piao, J., You, K., Guo, Y., Zhang, Y., Li, Z., Geong, L. (2017). “Substrate Stiffness Affects Epithelial-Mesenchymal Transition of Cervical Cancer Cells through MiR-106b and Its Target Protein DAB2.” *International Journal of Oncology* 50(6): 2033–2042.
- *Pipan, V., Zorc, M., Kunej, T. (2015). “MicroRNA Polymorphisms in Cancer: A Literature Analysis.” *Cancers* 7(3): 1806–1814.
- Rakheja, D., Chen, K. S., Liu, Y., Shukla, A. A., Schmid, V., Chang, T. C., Khokhar, S., Wickiser, J. E., Karandikar, N. J., Malter, J. S., Mendell, J. T., Amatruda, J. F.

- (2014). “Somatic Mutations in DROSHA and DICER1 Impair MicroRNA Biogenesis through Distinct Mechanisms in Wilms Tumours.” *Nature* 2:4802.
- Riazalhosseini, B., Mohamed, R., Apalasy, Y. D., Langmia, I. M., Mohamed, Z. (2017). “Circulating MicroRNA as a Marker for Predicting Liver Disease Progression in Patients with Chronic Hepatitis B.” *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50(2): 161–166.
- Ribeiro, J., Marinho-Dias, J., Monteiro, P., Loureiro, J., Baldaque, I., Medeiros, R., Sousa, H. (2015). “MiR-34a and MiR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development.” *Biomed Research International*: 304584.
- Riquelme, I., Tapia, O., Leal, P., Sandoval, A., Varga, M. G., Letelier, P., Buchegger, K., Bizama, C., Espinoza, J. A., Peek, R. M., Araya, J. C., Roa, J. C. (2016). “MiR-101-2, MiR-125b-2 and MiR-451a Act as Potential Tumor Suppressors in Gastric Cancer through Regulation of the PI3K/AKT/MTOR Pathway.” *Cellular Oncology* 39(1): 23–33.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., Bradley, A. (2004). “Identification of Mammalian MicroRNA Host Genes and Transcription Units.” *Genome Research* 14(10 A): 1902–1910.
- Rupaimoole, R., Ivan, C., Yang, D., Gharpure, K. M., Wu, S. Y., Pecot, C. V. Previs, R. A., Nagaraja, A. S., Armaiz-pena, G. N., McGuire, M., Pradeep, S., Mangala, L. S., Rodriguez, C., Huang, L., Bar-Eli, M., Zhang, W., Lopez-Berestein, G., Calin, A., Sood, A. K. (2016). “Hypoxia-Upregulated MicroRNA-630 Targets Dicer, Leading to Increased Tumor Progression.” *Oncogene* 35(33): 4312–4320.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). “Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia.” *SCIENCE* 230(4732): 1350-1354.
- Schmitt, M., Bravo, I. G., Snijders, P. J., Gissmann, L., Pawlita, M., Waterboer, T. (2006). “Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses.” *Journal of Clinical Microbiology* 44(2): 504–512.
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., Pawlita, M. (2008). “Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers.” *Journal of Clinical Microbiology* 46(3): 1050–1059.
- Serrano, B., de Sanjosé, S., Tous, S., Quiros, B., Muñoz, N., Bosch, X., Alemany, L. (2015). “Human Papillomavirus Genotype Attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in Female Anogenital Lesions.” *European Journal of Cancer* 51(13): 1732–1741.
- Shi, T. Y., Chen, X. J., Zhu, M. L., Wang, M. Y., He, J., Yu, K. D., Shao, Z. M., Sun, M. H., Zhou, X. Y., Cheng, X., Wu, X., Wei, Q. (2013). “A Pri-MiR-218 Variant and Risk of Cervical Carcinoma in Chinese Women.” *BMC cancer* 13:19..
- Shi, Y., Chen, C., Zhang, X., Liu, Q., Xu, J. L., Zhang, H. R., Yao, X. H., Jiang, T., He, Z. C., Ren, Y., Cui, W., Xu, C., Liu, L., Cui, Y. H., Yu, S. Z., Ping, Y. F., Bian, X. W. (2014). “Primate-Specific MiR-663 Functions as a Tumor Suppressor by Targeting PIK3CD and Predicts the Prognosis of Human Glioblastoma.” *Clinical Cancer Research* 20(7): 1803–1813.
- Siddiqui, M. A., Perry, C. M. 2006. “Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine (Gardasil).” *Drugs* 66(9): 1263-1271.
- Silverberg, M. J., Lau, B., Justice, A. C., Engels, E., Gill, M. J., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Souza, G. D., Bosch, R. J., Brooks, J. T., Napravnik, S., Hessol, N. A., Jacobson, L. P., Kitahata, M. M., Klein, M. B., Moore, R. D., Rodriguez, B., Rourke, S. B.,

- Saag, M. S. (2012). "Risk of Anal Cancer in HIV-Infected and HIV-Uninfected Individuals in North America." *Clinical Infectious Diseases* 54(7): 1026-1034.
- Smeets, S. J., Hesselink, A. T., Speel, E. J., Haesevoets, A., Snijders, P. J., Pawlita, M., Meijer, C. J., Braakhuis, B. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H. (2007). "A Novel Algorithm for Reliable Detection of Human Papillomavirus in Paraffin Embedded Head and Neck Cancer Specimen." *International Journal of Cancer* 121(11): 2465–72.
- *Stier, E. A., Chigurupati, N. L., Fung, L. (2016). "Prophylactic HPV Vaccination and Anal Cancer." *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 12(6): 1348–51.
- Strmsej, Z., Kunej, T. (2014). "Data Integration of 104 Studies Related with MicroRNA Epigenetics Revealed That MiR-34 Gene Family Is Silenced by DNA Methylation in the Highest Number of Cancer Types." *Discoveries Journals* 2(2): 1–12.
- Su, Z., Ni, L., Yu, W., Yu, Z., Chen, D., Zhang, E., Li, Y., Wang, Y., Li, X., Yang, S., Gui, Y., Lai, Y., Ye, J. (2015). "MicroRNA-451a Is Associated with Cell Proliferation, Migration and Apoptosis in Renal Cell Carcinoma." *Molecular Medicine Reports* 11(3): 2248–2254.
- Tachezy, R., Smahelova, J., Salakova, M., Arbyn, M., Rob, L., Skapa, P., Jirasek, T., Hamsikova, E. (2011). "Human Papillomavirus Genotype Distribution in Czech Women and Men with Diseases Etiologically Linked to HPV." *PLoS One* 6(7): e21913.
- Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E., Ohtani, N. (2010). "Intrinsic Cooperation between P16INK4a and P21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression In Vivo." *Cancer Research* 70(22): 9381–9390.
- *Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2019). "Regulation of MicroRNA Biogenesis and Its Crosstalk with Other Cellular Pathways." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(1): 5-20.
- Varadhachary, G. R., Spector, Y., Abbruzzese, J. L., Rosenwald, S., Wang, H., Aharonov, R., Carlson, H. R., Cohen, D., Karanth, S., Macinkas, J., Lenzi, R., Chajut, A., Edmonston, T. B., Raber, M. N. (2011). "Prospective Gene Signature Study Using MicroRNA to Identify the Tissue of Origin in Patients with Carcinoma of Unknown Primary." *Clinical Cancer Research* 17(12): 4063–4070.
- Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Dürst, M., Schneider, A., Doeberitz, M. V. K. (2008). "Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions." *Cancer Research* 68(1): 307–313.
- Vojtechova, Z., Sabol, I., Salakova, M., Smahelova, J., Zavadil, J., Turek, L., Grega, M., Klozar, J., Prochazka, B., Tachezy, R. (2016). "Comparison of the MiRNA Profiles in HPV-Positive and HPV-Negative Tonsillar Tumors and a Model System of Human Keratinocyte Clones." *BMC cancer* 16(1): 382.
- Vojtechova, Z., Zavadil, J., Klozar, J., Grega, M., Tachezy, R. 2017. "Comparison of the MiRNA Expression Profiles in Fresh Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tonsillar Tumors." *PLoS One* 12(6): 1–19.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A. 2005. "A MicroRNA Expression Signature of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets." *PNAS* 103(7): 2257-2261.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., Munoz, N. (1999). "Human Papillomavirus

- Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide.” *The Journal of Pathology* 189(1): 12–19.
- Wan, Y., Vagenas, D., Salazar, C., Kenny, L., Perry, C., Calvopina, D., Punyadeera, C. (2017). “Salivary MiRNA Panel to Detect HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Cancer Patients.” *Oncotarget* 8(59): 99990–100001.
- Wang, J., Ying, Y., Bo, S., Li, G., Yuan, F. E. I. (2016). “Differentially Expressed MicroRNA-218 Modulates the Viability of Renal Cell Carcinoma by Regulating BCL9.” *Molecular Medicine Reports* 14(2): 1829–1834.
- Wang, L., Chang, L., Li, Z., Gao, D., Cai, D., Tian, Y., Zeng, L., Li, M. (2014). “MiR-99a and -99b Inhibit Cervical Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting MTOR Signaling Pathway.” *Medical Oncology* 31(5): 934.
- Wang, X., Wang, H. K., McCoy, J. P., Banerjee, N. S., Rader, J. S., Broker, T. R., Meyers, C., Chow, L. T., Zheng, Z. M. (2009). “Oncogenic HPV Infection Interrupts the Expression of Tumor-Suppressive MiR-34a through Viral Oncoprotein E6.” *RNA* 15(4): 637–47.
- Wasson, C. W., Morgan, E. L., Müller, M., Ross, R. L., Hartley, M., Roberts, S., Macdonald, A. (2017). “Human Papillomavirus Type 18 E5 Oncogene Supports Cell Cycle Progression and Impairs Epithelial Differentiation by Modulating Growth Factor Receptor Signalling during the Virus Life Cycle.” *Oncotarget* 8(61): 103581–103600.
- Wei, Q., Li, Y. X., Liu, M., Li, X., Tang, H. 2012. “MiR-17-5p Targets TP53INP1 and Regulates Cell Proliferation and Apoptosis of Cervical Cancer Cells.” *IUBMB Life* 64(8): 697–704.
- Wilting, S. M., Snijders, P. J. F., Verlaat, W., Jaspers, A., van de Wiel, M. A. van Wieringen, W. N., Meijer, G. A., Kenter, G. G., Yi, Y., Sage, C. (2013). “Altered MicroRNA Expression Associated with Chromosomal Changes Contributes to Cervical Carcinogenesis.” *Oncogene* 32(1): 106–116.
- Wong, T., Liu, X. B., Wong, B. Y. H., Ng, R. W. M., Yuen, A. P. W., Wei, W. I. (2008). “Human Cancer Biology Mature MiR-184 as Potential Oncogenic MicroRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue.” *Human Cancer Biology* 14(9): 2588–2593.
- Wook, J., Nickel, K. P., Torres, A. D., Lee, D., Lambert, P. F., Kimple, R. J. (2014). “Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Causes a Delay in Repair of DNA Damage.” *Radiotherapy and Oncology* 113(3): 337–344.
- Wu, H., Zhang, J. (2014). “MiR-124 Rs531564 Polymorphism Influences Genetic Susceptibility to Cervical Cancer.” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7(12): 5847–5851.
- Xie, H., Lim, B., Lodish, H. F. (2009). “MicroRNAs Induced During Adipogenesis That Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity.” *Diabetes* 58(5): 1050–1057.
- Xin, F., Liu, P., Ma, C. F. (2016). “A Circulating Serum MiRNA Panel as Early Detection Biomarkers of Cervical Intraepithelial Neoplasia.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 20(23): 4846–4851.
- Yao, T., Lin, Z. (2012). “Biochimica et Biophysica Acta MiR-21 Is Involved in Cervical Squamous Cell Tumorigenesis and Regulates CCL20.” *BBA - Molecular Basis of Disease* 1822(2): 248–260.
- Ye, C., Sun, N. X., Ma, Y., Zhao, Q., Zhang, Q., Xu, C., Wang, S. B., Sun, S. H., Wang, F., Li, W. (2015). “MicroRNA-145 Contributes to Enhancing Radiosensitivity of Cervical Cancer Cells.” *FEBS Letters* 589(6): 702–709.
- Yi, Yuexiong et al. 2018. “The Role of MiR-106p-5p in Cervical Cancer: From Expression to Molecular Mechanism.” *Cell Death Discovery*.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., Cullen, B. R. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes & Development* 17(24): 3011–3016.
- Yu, J., Wang, Y., Dong, R., Huang, X., Ding, S., Qiu, H. (2012). "Circulating MicroRNA-218 Was Reduced in Cervical Cancer and Correlated with Tumor Invasion." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138(4): 671–674.
- Zaman, M. S., Thamminana, S., Shahryari, V., Chiyomaru, T., Deng, G., Saini, S., Majid, S., Fukuhara, S., Chang, I., Arora, S., Hirata, H., Ueno, K., Singh, K., Tanaka, Y., Dahiya, R. (2012). "Inhibition of PTEN Gene Expression by Oncogenic MiR-23b-3p in Renal Cancer." *PLoS One* 7(11): e50203.
- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Shah, A., Willeit, J., Mayr, M. (2010). "Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss of Endothelial MiR-126 and Other MicroRNAs in Type 2 Diabetes." *Circulation Research* 107(6): 810-U359.
- Zeng, K., Zheng, W., Mo, X., Liu, F., Li, M., Liu, Z., Zhang, W., Hu, X. (2015). "Dysregulated MicroRNAs Involved in the Progression of Cervical Neoplasm." *Archives of Gynecology and Obstetrics* 292(4): 905–913.
- Zhang, B., Li, P., Wang, E., Brahmi, Z., Dunn, K. W., Blum, J. S., Roman, A. (2003). "The E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Perturbs MHC Class II Antigen Maturation in Human Foreskin Keratinocytes Treated with Interferon-gamma." *Virology* 310(1): 100–108.
- Zhang, C., Chen, B., Jiao, A., Li, F., Sun, N., Zhang, G., Zhang, J. (2018). "MiR-663a Inhibits Tumor Growth and Invasion by Regulating TGF- β 1 in Hepatocellular Carcinoma." *BMC cancer* 18(1): 1179.
- Zhao, S., Yao, D., Chen, J., Ding, N. (2013). "Circulating miRNA-20a and miRNA-203 For Screening Lymph Node Metastasis in Early Stage Cervical Cancer." *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 17(8): 631–636.
- Zhou, M., Chen, X., Wu, J., He, X., Ren, R. (2018). "MicroRNA-143 Regulates Cell Migration and Invasion by Targeting GOLM1 in Cervical Cancer." *Oncology Letters* 16(5): 6393–6400.
- Zhou, X., Yue, Y., Wang, R., Gong, B., Duan, Z. (2017). "MicroRNA-145 Inhibits Tumorigenesis and Invasion of Cervical Cancer Stem Cells." *International Journal of Oncology* 50(3): 853–862.
- Zhou, X., Chen, X., Hu, L., Han, S., Qiang, F., Wu, Y., Pan, L., Shen, H., Li, Y., Hu, Z. (2010). "Polymorphisms Involved in the MiR-218 - LAMB3 Pathway and Susceptibility of Cervical Cancer, a Case – Control Study in Chinese Women." *Gynecologic Oncology* 117(2): 287–290.
- Zhu, L., Tu, H., Liang, Y., Tang, D. (2018). "MiR-218 Produces Anti-Tumor Effects on Cervical Cancer Cells in Vitro." *World Journal of Surgical Oncology* 16(1): 204.
- zur Hausen, H. 2009. "The Search for Infectious Causes of Human Cancers: Where and Why." *Virology* 392(1): 1–10.
- zur Hausen, H. 1976. "Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer." *Cancer Research* 36(2): 8–9.